

Espaceenet

Bibliographic data: WO 0202762 (A1)

NOVEL LIPASE

Publication date:	2002-01-10
Inventor(s):	INOUE KEIZO [JP]; ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +
Applicant(s):	MOCHIDA PHARM CO LTD [JP]; INOUE KEIZO [JP]; ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +
Classification:	- international: C07K16/40; C12N15/55; C12N9/16; A61K38/00; (IPC1-7): A61K38/43; C07K16/40; C12N15/55; C12N9/16 - European: C07K16/40; C12N9/16
Application number:	WO2000JP04441 20000703
Priority number(s):	WO2000JP04441 20000703
Also published as:	EP 1298205 (A1) CA 2416191 (A1)
Cited documents:	JP10201479 (A) View all...

Abstract of WO 0202762 (A1)

A novel phospholipase A1 (PLA1) having a substrate specificity to phosphatidic acid (PA); a peptide or a polypeptide originating in the above novel PLA1; a polynucleotide encoding the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; a process for producing the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; an antibody against the peptide or polypeptide originating in the novel PLA1; a method of identifying an inhibitor, an antagonist or an activator of the novel PLA1 by using the same; compounds identified by the above method; and medicinal compositions and diagnostic methods by using the same.

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2002年1月10日 (10.01.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/02762 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/16, 15/55, C07K 16/40, A61K 38/43 [JP/JP]; 〒112-0002 東京都文京区小石川5丁目35番8号 クレアホームズ604号室 Tokyo (JP). 青木淳賢 (AOKI, Junken) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都世田谷区下馬2丁目 21番25号 中銀世田谷マンション2号棟306号室 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04441 (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000年7月3日 (03.07.2000) (25) 国際出願の言語: 日本語 (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国(国内): CA, JP, US.

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井上圭三 (INOUE, Keizo) [JP/JP]; 〒357-0041 埼玉県飯能市美杉台5丁目2番7号 301号室 Saitama (JP). 新井洋由 (ARAI, Hiroyuki) 添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL LIPASE

(54) 発明の名称: 新規リバーゼ

(57) Abstract: A novel phospholipase A₁ (PLA₁) having a substrate specificity to phosphatidic acid (PA); a peptide or a polypeptide originating in the above novel PLA₁; a polynucleotide encoding the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; a process for producing the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; an antibody against the peptide or polypeptide originating in the novel PLA₁; a method of identifying an inhibitor, an antagonist or an activator of the novel PLA₁ by using the same; compounds identified by the above method; and medicinal compositions and diagnostic methods by using the same.

(57) 要約:

本発明は、ホスファチジン酸 (PA) に対する基質特異性を有する新規なホスホリバーゼA₁ (PLA₁) および該新規PLA₁由来のペプチドまたはポリペプチド、新規PLA₁由来のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、新規PLA₁由来のペプチドまたはポリペプチドの製造法、新規PLA₁由来のペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、およびこれらを利用して新規PLA₁の阻害剤、拮抗剤、賦活剤の同定を行なう方法、さらにこの方法で同定された化合物を提供することであり、またこれらを利用した医薬組成物および診断方法を提供する。

WO 02/02762 A1

明細書

新規リバーゼ

技術分野

5 本発明は、新規なリバーゼ、特にホスホリバーゼA₁（phospholipase A₁；以下PLA₁と呼ぶこともある）に関するものである。さらに詳しくは、新規PLA₁のアミノ酸配列の全部または一部を有するペプチドまたはポリペプチド、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチドまたはポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物の同定方法、該同定された化合物、該ポリペプチドもしくは該ポリヌクレオチドに作用する活性阻害化合物または活性賦活化合物、これらに関係する医薬組成物とその製造方法およびこの医薬組成物を用いた治療方法、並びにこれらに関係する疾病診断方法に関する。

背景技術

PLA₁は、グリセロリン脂質のグリセロール1位のエステル結合を加水分解する酵素である。これまでに様々な臓器でこの酵素活性の存在が検出されており、また基質特異性により区別されるいくつかのPLA₁が報告されている。cDNAクローニングされているものとしては、蜂毒のPLA₁（Dolm1）、PS-PLA₁〔ホスファチジルセリン（PS）およびリゾホスファチジルセリン（lysophPS）のグリセロールの1位のエステル結合を特異的に加水分解する（特開平10-201479号）（蛋白質核酸酵素，44，1038-1042，1999〕、ヒト精巣のPA-PLA₁〔ホスファチジン酸（PA）のグリセロールの1位のエステル結合を特異的に加水分解する（J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998〕等がある。また、リバーゼファミリー

の分子は、しばしばトリアシルグリセロールを分解する活性以外に、PLA₁活性を併せ持つことが知られている (FEBS Letters, 320, 145–149, 1993) (Biochemistry, 32, 4702–4707, 1993) (J. Biol. Chem., 272, 2192–2198, 1997)。

5 さらに、これまでに見つかっているリバーゼファミリーに属するPLA₁は全て、短いリッド (Lid) (B. B. A., 1376, 417–432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702–4707, 1993) を有するが、その生理的意義は必ずしも明らかになっていない。また、リバーゼ分子上の糖鎖がリバーゼ活性に関与する可能性が示唆されている (J. Lipid Res., 35, 1511–1523, 1994) (J. Lipid Res., 36, 939–951, 1995)。

PLA₁の機能の一つにリン脂質 (phospholipid) を分解する作用があるが、生成物のひとつであるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid; 以下 LPA と略称することもある) (B. B. A., 1198, 185–196, 1994) には多くの生理活性が知られており、生物学的有用性において着目されている [細胞工学, 17, (5), 739–745, 1998]。LPA の主要な作用としては、血圧の上昇作用 (Lipids, 13, 572–574, 1978)、血小板凝集作用 (Am. J. Pathol., 96, 423–438, 1979)、細胞増殖促進作用 (Cell, 59, 45–54, 1989) があり、またこれら以外にも、ガン細胞の浸潤促進、細胞接着、ストレスファイバーの形成、化学走性誘発、神経突起の退縮、アポトーシスの抑制、創傷治癒への関連等多様な作用が報告されている (B. B. A., 1198, 185–196, 1994)。

25 ホスファチジン酸 (phosphatidic acid; 以下 PA と略称することもある) に対して特異性を持つ PLA₁としては、ヒト精巣 PA-PLA₁ が知られており、cDNA もクローニングされているが、新規 PLA₁ は細胞内の酵素であり、リン脂質代謝の中心であるホスファチジン酸の sn-1 位の脂

肪酸の代謝回転を決定する因子として捉えられている (J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998)。また、ヒト精巣PA-PLA₁は反応条件によっては、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)も加水分解することが報告されている。

5 本発明は、上記のように多様な、ある局面においてはむしろ悪益な作用の原因物質となり得るLPAの產生触媒たるPLA₁に関する新規な物質を見いだし、生体内におけるLPAの制御を可能にすることを目的のひとつとするものである。

発明の開示

10 本発明は、(1) 下記の群より選ばれるポリペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、

②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、

③前記①のポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有しかつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、

15 および

④前記アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、(2)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも約8個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、(3)前記1または2のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(4)前記3のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、(5)配列表の配列番号2に記載の塩基配列またはその相補的配列の少なくとも約15個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド、(6)前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(7)前記6の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(8)前記7の形質転換体を培養する工程を含む、前記1または2のポリペプチドまたはペプチドの製造方法、(9)前記1または2のポリペプチドまたはペプチドを免疫学

20

25

的に認識する抗体、(10)ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、前記9の抗体、(11)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および／または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法、(12)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(13)前記1のポリペプチドまたは前記3もしくは4のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、前記7の形質転換体と、該形質転換体中で発現される前記1のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、

化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(14)前記1ないし13の方法で同定される化合物、(15)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物、(16)前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体、または前記14もしくは15の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物、(17)個体における前記1のポリペプチドの発現または活性に関連した疾患の診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む方法、(18)前記16の医薬組成物をホスホリバーゼA₁に関連する疾患に用いることを特徴とする治療方法、(19)前記16の医薬組成物の製造方法、からなる。

.5

図面の簡単な説明

図1は、新規PLA₁の塩基配列とESTデータベースから得られた塩基配列の関係を説明する図である。図中、ATGは開始コドン、S、D、Hは活性トライアド、C-Cはリッド領域、EST配列中の破線はEST塩基配列の欠失がある領域である。

図2は、新規PLA₁の配列およびその配列の特徴を説明する図である。図中、二重下線はシグナル配列、下線は糖鎖付加予測部位、両矢印の下線はリバーゼコンセンサス配列およびリッド領域、四角（斜線入り）で囲んだS、D、Hは活性トライアド、四角（白抜き）はRGD配列を示す。

図3は、新規PLA₁と、該新規PLA₁に相同意を有するリバーゼのアミノ酸配列を比較するマルチプルアラインメント図である。

図4は、リバーゼファミリーの構造の模式図（図4A）およびPLA₁／リバ

ーゼファミリーの系統樹を示す図（図4B）である。

図5は、新規PLA₁組換え型蛋白質の昆虫細胞における発現をウエスタンブロッティング法により確認した図である。図5Aは発現させたコンストラクトの模式図であり、図5Bはウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

5 図6は、新規PLA₁のヘパリンカラムを用いた精製の結果を示す図である。

図6Aはヘパリンカラムによる分画の結果を、図6Bは各画分中の新規PLA₁をウエスタンブロッティング法により確認した結果を示す。

10 図7は、新規PLA₁（図7A）とEDG7（図7B）のmRNAの組織分布を示す図である。図7Cは、内部標準プローブとして用いた常発現性遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）の発現を示す。

図8は、卵巣癌細胞およびヒト血小板における新規PLA₁蛋白質の発現を示す図である。

15 図9は、新規PLA₁の作用を検討するための、新規PLA₁発現細胞とFura2を取り込ませたLPA受容体EDG7発現細胞とを用いるバイオアッセイシステムを説明する図である。

図10（a～f）は、新規PLA₁を発現させたSf9が、LPA受容体EDG7を発現させたSf9の細胞内Ca²⁺濃度を上昇させることを示す図である。

図11（A～F）は、新規PLA₁が媒介するLPA産生におけるPLDの関与を示す図である。

20

発明を実施するための最良の形態

（新規PLA₁）

本発明において提供される新規PLA₁は、cDNAライブラリーから、新規なアミノ酸配列を有する物質としてそのcDNAが取得されたものである。そして、本発明から成る新規PLA₁は、ヒトの肺、腎臓、膵臓、前立腺、睾丸、卵巣、結腸において、その存在がノザンブロッティング法によって確認された。本発明からなる新規PLA₁の性質は以下である。リン脂質、特にホスファチジン

酸（P A）に作用してL P Aを生成する。基質特異性として、P Aに対して高い特異的活性をもつ。リバーゼファミリーに保存されるコンセンサス配列および触媒トライアドならびにリッドと考えられるアミノ酸を有する。また、既知P L A₁類との相同性は約40%未満である。

5

（ポリペプチドまたはペプチド）

本発明の新規P L A₁のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に記載のポリペプチドである。さらに本発明のポリペプチドまたはペプチドは、該配列表の配列番号1に記載のポリペプチドの少なくとも一部分を含有するポリペプチドまたはペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号1に記載のポリペプチドと、アミノ酸配列上で約40%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%、特に好ましくは約95%以上の相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドまたはペプチドの選択は、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性および／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標にして可能である。上記分解活性は公知の方法、例えば、放射性同位体（R I）標識基質、蛍光基質、もしくは発色基質を用いた方法、または実施例に記載の方法で測定できる（J. Biochem., 103, 442-447, 1988）（J. Biochem., 117, 1280-1287, 1995）（J. Biochem., 101, 53-61, 1987）（J. Biol. Chem., 235, 2595-2599, 1960）（J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997）。

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、c D N Aの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が挙げられる。

本発明のポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号1に記載のポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドを包含し、これらは例え

ば試薬、標準物質、または免疫原として利用できる。その最小単位としては 8 個以上のアミノ酸、好ましくは 10 個以上のアミノ酸、より好ましくは 12 個以上、さらに好ましくは 15 個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定し得るポリペプチドまたはペプチドを本発明の 5 対象とする。これらのペプチドは、試薬もしくは標準物質、または後述するように新規 P L A₁ に特異的な抗体を作製するための抗原として単独またはキャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン等）と結合して使用できるが、これらのように別種の蛋白質または物質を結合したものも本発明の範囲に包含される。

.0 さらに、このように特定されたポリペプチドまたはペプチドを基にして、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性および／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標とすることにより、1 以上、例えば 1 ~ 100 個、好ましくは 1 ~ 30 個、より好ましくは 1 ~ 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 10 個、特に好ましくは 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはペプチドも提供される。欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（P C R）を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編〔モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル 第 2 版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編〔ラボマニュアル遺伝子工学〕丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H E. 編〔P C R テクノロジー、D N A 増幅の原理と応用〕ストックトンプレス、1989 等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えば Ulmer の技術（S c i e n c e, 219, 666, 1983）を利用するこ 10 ことができる。

.5 .10 .15 上記のような変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ

酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。後述するように、リバーゼファミリーのコンセンサス配列およびリッド領域は活性の発現または調節に重要と考えられ、これらを含有する領域、特に触媒トライアドを含むコンセンサス配列は一次配列上および／または立体構造上保持されていることがPLA₁活性、特にPA-PLA₁活性を維持するためには好ましい。また、本発明のポリペプチドまたはペプチドは、糖鎖の有無に拘わらず本発明の範囲に包含されるが、糖鎖が活性に影響する可能性もあるため、少なくとも1つのグリコシレーションサイトは保持されていることが好ましい。

本発明においては、配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示されるポリペプチドと同様のPLA₁活性を有するポリペプチドまたはその最小活性単位（領域もしくはドメイン）も提供されるが、それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドが提供される。これらは、例えばPLA₁活性様物質もしくはPLA₁拮抗物質として、またはPLA₁活性を調節する物質のスクリーニング等において有用である。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

さらに、本発明のポリペプチド等の検出もしくは精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別の蛋白質、例えばアルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片またはFLAG-tag等のペプチドを直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易であり、これらの別の物質を結合したポリペプチド等も本発明の範囲に包含される。

(ポリヌクレオチド)

一つの態様において、本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対

する相補鎖を意味する。これらは例えば上記新規PLA₁の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。好ましいポリヌクレオチドを示す配列表の配列番号2において、塩基番号89のA(adenine)から塩基番号1441のG(guanine)

5 までがコーディング領域と推定される。また、アミノ酸配列のアミノ酸番号1のM(Met)からアミノ酸番号19のE(Glu)までをコードしているatg
～gaaはシグナル配列をコードしているものと推定される。なお、本発明の新規PLA₁遺伝子の塩基配列に、ヒト個体間における多型の存在が認められた。
その中の一例では、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の塩基番号1088の
10 G(guanine)がT(thymine)に置換され、結果としてアミノ酸番号334のD(Asp)がY(Tyr)に置換されており、別の例では、配列表の配列番号2に記載の塩基配列の塩基番号1204のA(adenine)がG(guanine)に置換され、この例においてはアミノ酸置換は無いと考えられた。

5 別の態様において本発明は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編【モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル 第2版】コードスプリングハーバーラボラトリー、(1989)等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号2の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号2の塩基配列またはその相補配列に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上である。また本発明のポリヌクレオチドは、指定さ

れた塩基配列の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそれらの相補鎖を包含する。

これらのポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド等の製造において、新規PLA₁をコードする核酸、例えば、その遺伝子、もしくはmRNA検出のためのプローブもしくはプライマーとして、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。例えば、アンチセンスによって新規PLA₁の発現を特異的に阻害するためには、リバーゼファミリーで保存されているコンセンサス配列領域以外の新規PLA₁に固有な領域の塩基配列を用いることが想定される。一方、保存配列を用いることにより新規PLA₁を含む複数のリバーゼの発現を同時に抑制することも可能と考えられる。ここで、新規PLA₁または同様の活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性特にホスファチジン酸を分解する活性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる (Nature, 179, 160~161, 1957)。

10 (形質転換体)

上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によっても、本発明からなる新規PLA₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドは提供可能である。本発明の具体例においては、昆虫細胞を利用したが、無論これに限定されるものではない (日本国特許第2129487号および第2644447号: 組み替えバキュウロウィルス発現ベクターの製法とポリペプチドの合成)。なお、本発明の新規PLA₁遺伝子がコードするPLA₁は糖蛋白質で

あるため、ポリペプチドまたはペプチドに糖鎖を付加し得る宿主である動物細胞等の宿主を用いることが好ましい。

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系 5 としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に 10 関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。本発明の具体例においては、バキュロウイルス系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現產生される新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドお 15 よびポリペプチドの酵素活性、特にホスファチジン酸を分解する酵素活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッ チにより生産してもよい。

(新規 P L A₁ およびその由来物回収)

10 培地からの新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの回収は、ホスファチジン酸を分解する酵素活性を指標にして、分子篩、イオ ンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫安、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作成 15 し、ポリクローン抗体またはモノクローン抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。簡便には、ヘパリンを利用したアフィニティクロマトグラフ ィーが利用できる。

(抗体)

抗体は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原は新規 P L A₁ またはその断片でもよく、少なくとも 8 個、好ましくは少なくとも 10 個、より好ましくは少なくとも 12 個、さらに好ましくは 15 個以上のアミノ酸で構成される。新規 P L A₁ に特異的な抗体を作製するためには、リバーゼファミリーのコンセンサス配列領域以外の新規 P L A₁ に固有な配列からなる領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号 1 と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有効である。抗体は、免疫学的に新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

抗体を產生するためには、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを、単独または担体に結合して、アジュvant の存在または非存在下で、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体產生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P 3 X 6 3 A g 8 株等の骨髄腫細胞株等）との融合によりハイブリドーマを作製する。これをさらにクローン化した後、本発明の P L A₁ を

特異的に認識する抗体を產生しているハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

P L A₁活性を抑制し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規P L A₁に結合し、その活性を制御することができ、リ
5 リン脂質特にP AからのL P A產生系の制御を容易に行うことができる。そのため、L P Aが関連する各種悪益的疾患の治療および／または予防のために有用である。

(化合物の同定・スクリーニング方法)

かくして調製された新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドまたはポ
10 リペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを用いる蛋白質合成系並びに新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組合せることによって、新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチド
15 またはポリヌクレオチドに対する活性の調節物質または調節剤、例えば活性阻害剤または活性賦活剤の同定方法またはスクリーニング方法に有効な手段を提供する。例えば、ペプチドまたはポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニング
20 システムにおいて、利用可能である。ここで上記の調節とは、阻害、拮抗、活性化、活性促進、活性賦活等を含む。

また、本発明の新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペ
25 プチドまたは本発明のポリヌクレオチドもしくは形質転換体は、スクリーニング候補の化合物とこれらペプチドまたはポリペプチド等との間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナル（マー
カ）を使用する系を導入し、このシグナル（マーク）の存在もしくは不存在、またはシグナル量の変化を検出することにより、本発明の新規P L A₁およびそ

の由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの活性を賦活もしくは阻害する化合物、または本発明のポリヌクレオチドの発現を阻害もしくは促進する化合物を同定することができる。シグナル（マーカー）を使用する系としては、本発明のポリペプチドの活性、例えば、P A等の基質を分解する活性を測定する系または
5 ポリヌクレオチドの発現量を測定する系が含まれ、具体的には実施例に例示されている。これらは公知の方法を応用してもよい。

また本発明の新規 P L A₁ またはその由来物からなるポリペプチドを発現させた形質転換体と、該形質転換体中で発現される新規 P L A₁ またはその由来物からなるポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホ
10 スファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物と前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、新規 P L A₁ およびその由来物から
15 なるポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物を同定することができる。上記形質転換体としては、例えば本発明の新規 P L A₁ またはその由来物からなるポリペプチドを発現させた S f 9 細胞と、L P A 受容体 E D G 7 を発現させた S f 9 細胞との組み合
わせが挙げられるが、これに限定されない。また、本発明の新規 P L A₁ および
20 その由来物からなるポリペプチドの作用を検出するためのシグナルとしては、例
えば L P A 受容体 E D G 7 発現細胞に L P A が結合することにより上昇する細胞
内カルシウムを検出すればよい。細胞内カルシウムの検出は F u r a 2 等を用い
る自体公知の測定法を応用することができる。なお、本発明のポリペプチド等を
他のリバーゼの相同物（すなわち、ポリペプチド等）または L P A に置き換えた
25 対照系における反応と比較することにより、化合物の作用の特異性を確認するこ
とができる。また、各形質転換体は、対応する遺伝子の発現が確認された細胞株
などに置き換えてもよい。

(化合物、医薬組成物)

このようにして同定された化合物は、新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドに関する、活性もしくは作用の阻害剤、拮抗剤、活性化剤、促進剤、または賦活剤の候補化合物として、利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規 P L A₁ およびその由来物に対する発現阻害剤、発現拮抗剤、発現活性化剤、発現促進剤、発現賦活剤の候補化合物としても利用可能である。その効果は、L P A に由来する各種悪益的症状の予防および／または治療を期待できる。

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。また本発明からなる新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を、診断マーカーもしくは試薬等の疾患診断手段として、または新規 P L A₁ の発現、活性、もしくは作用を阻害、拮抗、活性化、促進、賦活する機能を利用した治療薬等の医薬手段として使用し得る。なお、製剤化にあたっては、ペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

上記医薬組成物は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、抗体、および上記本発明の化合物を利用して製造することが可能である。上記医薬組成物は、P L A₁ 特に新規 P L A₁ に関連する疾患の治療に有用である。

診断手段としては、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現または活性に関連する疾患の診断手段として有用であり、診断は例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ペ

プチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量または活性量を決定すること等によって行われる。すなわち、新規 P L A₁ を診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、P C R 反応系等を利用すればよい。さらに、前述したように、個体による多型の存在が認められるので、公知の方法により単一ヌクレオチド多型（S N P）を検出することも有用な診断手段である。

実施例

10 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(遺伝子の単離)

ホスファチジルセリンを特異的に加水分解するラットホスホリパーゼA₁ (P S - P L A₁) (J. Biol. Chem., 272, (4), 2192-2198, 1997) のアミノ酸配列をプローブとして、d b E S T (d a t a b a s e o f E x p r e s s e d S e q u e n c e T a g s) に対して、ホモロジーサーチ (t b l a s t n s e a r c h) を実施した。その結果、未知の核酸配列で相同意スコアの比較的高かった、受託番号 (a c c e s s i o n n o.) A A 1 4 9 7 9 1、A A 1 0 2 3 2 2 の 2 種類の E S T 配列を得た。

10 次に、受託番号 (a c c e s s i o n n o.) A A 1 0 2 3 2 2 の核酸配列をプローブとして、d b E S T に対してホモロジーサーチ (b l a s t n s e a r c h) を実施した。

その結果、受託番号 (a c c e s s i o n n o.) A A 3 6 7 3 6 8 の配列と、A A 1 4 9 7 9 1 の配列とが重なる塩基配列領域を有することが明らかとなった 15 (図1)。これらの配列を、重複する領域で並べたところ、A A 1 4 9 7 9 1 (翻訳開始コドンと予想されるメチオニン残基を含む配列)、A A 1 0 2 3 2 2 (A A 1 4 9 7 9 1 と重なりを有する配列)、A A 3 6 7 3 6 8 (A A 1 0 2 3 2 2 と大

幅に重なり、触媒トライアド等を含む配列) の順番で配置することが可能であることが判明した。次に、これらの配列を並べ、その特色を解析した。P S - P L A₁ や、リバーゼに特色的な、活性トライアドのアミノ酸残基や立体構造的に活性ポケット近傍にあるリッドと呼ばれるループ構造領域 (B. B. A., 1376, 5 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が存在することが予測され、その配列上の特色から新規なホスホリバーゼA₁である可能性が推測された。

10 (新規配列のクローニング)

実際に、上記解析で予測された新規PLA₁遺伝子配列を有するcDNAをクローニングする目的で、開始メチオニンコドンを有すると考えられたヒト大腸由来の部分的なcDNA配列 (accession no. AA149791) を含むクローンを、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。

該クローンの核酸配列を確認したところ、全長cDNAを含む可能性が示唆された。これがアーティファクトでないことを確認するため、該配列をもとに、PCRプライマーとして、配列表の配列番号3の5' - T G C G A A G T A A A T C A T T C T T G T G A A - 3' (フォワードプライマー配列) および配列表の配列番号4の5' - T G T G A C A T C C A T A G G A C G C T A C T G - 3' (リバースプライマー配列) の塩基配列のオリゴヌクレオチドを作製し、ヒトの大腸、肺、腎臓由来のRNA (Clontech) を用いて、RT-PCRした。増幅された遺伝子断片 (約1.5 kbp) を、プラスミドpBlueScript I I SK (Stratagene) をクローニング用のベクターとし、このマルチクローニングサイトEcoRI/XhoIにクローン化後、塩基配列を決定した。配列は、pBlueScript I I SKのマルチクローニングサイトのプライマーを使用し、EcoRI、PstI、HindIII、XhoIの

4個所の制限サイトを活用しながら、シークエンスを行った。次に、この配列とともに、プライマーオリゴマーを設計し、プライマーウオーキングの手法を用いて新規PLA₁と考えられた配列表の配列番号2の塩基配列を最終的に確認した(図2)。また、RT-PCR産物のダイレクトシークエンシングによっても配列を確認した。これらにより、塩基配列の2カ所に個体による多型を認めた。なお、該塩基配列を含有するプラスミドを含む大腸菌は受託番号FERM P-17428として工業技術院生命工学工業技術研究所に1999年6月22日付で寄託されている。さらに、2000年6月15日付で国際寄託に移管された(FERM BP-7188)。

この配列表の配列番号2に記載のcDNAは、配列表の配列番号1に記載の451アミノ酸残基からなる蛋白質を暗号化可能な、1353塩基からなるオープソリーディングフレームを含み、N末端領域に、シグナル配列と予想される領域を有していた。配列的な特色としては、アスパラギンリコシレーションサイトのモチーフであるN-{P}-[ST]-{P}を4個所(N(Asn)50-C(Cys)53、N(Asn)58-A(Ala)61、N(Asn)66-K(Lys)69、N(Asn)357-E(Glu)360))持ち、細胞結合領域のモチーフとして知られるRGD配列を1個所(R(Arg)344-D(Asp)346)含み、システイン残基を13個有していた。

10 (既存蛋白質との相同性)

塩基配列の翻訳によって予想されるアミノ酸配列を用いて、既存のデータベース(Genbank)に対してtblastnを用いたホモジーサーチを実施した。その結果、図3に示すように、本発明の新規リバーゼ(新規PLA₁)(colon lipase)はヒトPS-PLA₁(hPS-PLA₁)、胰臓型リバーゼ(human pancreatic lipase)、肝臓型リバーゼ(hepatic lipase)、リポプロテインリバーゼ(lipoprotein lipase)、胰臓リバーゼ関連蛋白質1(plrp1;pancreat

ic lipase related protein 1) および 2 (plr p2; pancreatic lipase related protein 2) と有意な相同性を示した。その他、立体構造的にリバーゼと相同性が高い領域があるとされるビテロジエニンとの相同性も高かった。これらの相同性が高かった既知蛋白質配列のうちビテロジエニンを除く上記各蛋白質において、酵素活性トライアドと予測されるアミノ酸残基 (S (Ser) 154、D (Asp) 178、H (His) 248) がすべて保存されているのが確認されたので、これらの配列を GENETYX Multiple Alignment モジュール (ソフトウェア開発株式会社) を用いて、マルチプルアラインメント表を作成した。

その結果、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列においては、図 2 に示すように、リバーゼファミリーに保存されているコンセンサス配列 GXSXG (G (Gly) 152-G (Gly) 156)、ITGLD (I (Ile) 174-D (Asp) 178) および CXH (C (Cys) 246-H (His) 248) (X は任意のアミノ酸を示す) が存在し、これらには触媒活性トライアドと考えられるアミノ酸残基が全て含まれていることが判明した。また、立体構造的に活性トライアドが存在するポケットの近傍に存在し、リバーゼの活性発現を調節しているリッドと呼ばれるループ構造 (P (Pro) 234-K (Lys) 245) が、PS-PLA₁ のそれと同じ残基数すなわち 12 個存在することが判明した。通常、PS-PLA₁ 以外のリバーゼ群は、リッド構造のアミノ酸残基数が長く、コリバーゼと呼ばれる蛋白性の因子が結合することによって活性が発現されることが知られている (B. B. A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が、比較的リッドが短い PS-PLA₁ については、コリバーゼの必要性は、現在まで明らかにされていない。従って、今回得た塩基配列から翻訳される蛋白質も、PS-PLA₁ に似た機構で活性を発現する可能性も予測される。図 6 A に、新規 PLA₁ と他の PLA₁ ファミリー

との構造を比較して模式図で示した。

次に、GENETYX Evolutional tree (UPGMA method) モジュール（ソフトウェア開発株式会社）によって、PLA₁リバーゼファミリーについて配列の進化的な系統樹を予測した。その結果、新規配列は、PS-PLA₁と最も進化的に近い配列であることが推測された（図6B）。以上のことから、新規配列が翻訳された蛋白質は、リバーゼ群に近く、特にホスホリバーゼに近縁な新規リバーゼであることが推測された。

（新規PLA₁の発現）

完全長cDNAを上述のpBlueScript II SK (-) から、EcoRI/XhoIで切り出し作製した。プラスミドpFASTBAC1（ライフテックオリエンタル社）中のマルチクローニングサイトにEcoRI/XhoIの制限酵素サイトでcDNAを組み込んだ。C末端側にFLAG-tag (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys) (Biotech nology, 6, 1205-1210, 1988) をつけたものに関しては、終止コドンを取り除き代わりに、配列表の配列番号6に記載のFLAG-tagをコードする核酸配列末端にHindIII部位を持った合成オリゴクレオチド（プライマー2）を作製し、また、配列表の配列番号5に記載の開始メチオニンの最初にBamHIを導入したオリゴヌクレオチド（プライマー1）を作製し、上述のpBlueScript II SK (-) をテンプレートに用いPCRを行い、cDNAを増幅した。

プライマー1：5' - CGC GGA TCC ATG TTG AGA TT
C TAC TTA TTC ATC - 3' (配列表の配列番号5)

5' プライマー2 : 5' - CCG GAA TTC TTA CTT GTC AT
C GTC GTC CTT GTA GTC CAA CTG CAA CT
C TGG GCA AAG AAT - 3' (配列表の配列番号6)

プラスミド pF_{AST}B_{AC}1 中のマルチクローニングサイトの、BamH I / EcoR I の制限酵素サイトに cDNA を組み込んだ後、大腸菌 JM109 に、構築した pF_{AST}B_{AC}1 をトランスフェクションし、ポジティブクローンを選択後、
5 該ポジティブクローンの培養を行いプラスミドを回収した。このプラスミドを、
DH10BACTMコンピーテントセル (GIBCO BRL) にトランスフェクションし、組換えBacmidを回収した。得られたBacmidは、Cell FECTINTM (pF_{AST}B_{AC}1)とともにSf9細胞(夜盗蛾Spodoptera frugiperdaさなぎ卵巣組織由来)にトランスフェクションした。
10 その結果、組換え型バキュロウイルス (Baculovirus) が培養上清中に回収された。

次に、蛋白質の発現を確認する目的で、回収したバキュロウイルスを Sf9 昆虫細胞に感染させ 27°C 96 時間培養した。培養した感染 Sf9 細胞は細胞画分と上清とに遠心分離し、それから抽出した蛋白質をサンプルとして SDS-PAGE を行い、ウエスタンブロッティングを FLAG-tag に対する抗体を用いて実施したところ、新規 PLA₁ は培養上清中にも少量分泌されるものの、その殆どが細胞画分より回収され、予想される新規 PLA₁ の分子量約 50 kDa 前後に複数のバンドが認められた (図 5)。この複数のバンドは新規 PLA₁ の糖鎖修飾によるものと考えられる。新規 PLA₁ は、そのアミノ酸配列の N 末端にシグナルペプチド様の配列を有するものの、細胞結合性 (cell-associated) の酵素と考えられる。以下、細胞結合性とは、細胞膜もしくは細胞内に存在する、または細胞膜に会合して存在することを意味する。上記手法により、新規 PLA₁ は昆虫細胞などを用いることによって細胞に発現させることを確認した。なお、以下に記載する新規 PLA₁ の精製においては、精製工程を簡便にするため、少量の新規 PLA₁ が含まれる培養上清を用いた。

(新規 PLA₁ の精製)

組換え型バキュロウイルス (Baculovirus) (日本国特許第2129487号および第2644447号: 組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法とポリペプチドの合成) 感染培養上清 500 ml を回収し、10,000 × g、20分、4°Cの遠心にて細胞断片を除き、さらに、フィルターをかけることにより (Falcon、ポアサイズ 0.45 μm) 培養上清中のゴミを除去した。FPLC system (Amersham-Pharmacia) を用い、上述した培養上清を、ヘパリンカラム (Hi-trap Heparin, Amersham-Pharmacia, 5 ml) に付し最終的に、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 存在下、100 mM から 1500 mM のNaCl で濃度勾配溶出を行った。溶出の分画は、2.5 ml づつ行い、全部で 20 フラクション分画した。新規 PLA₁ は約 1 M 前後の比較的高濃度の NaCl で溶出され、ヘパリンに対して高親和性を示した (図 6 A)。次に分画した各画分の一部を SDS-PAGE に付し、抗 FLAG-tag 抗体によってウエスタンブロッティングし、画分番号 10 ~ 16 に、分子量約 50 kDa の新規 PLA₁ が回収されていることを確認した (図 6 B)。

同様に対照として、野生型バキュロウイルス (wild type baculovirus) を感染させた培養上清を、上述のようにヘパリンカラムに付し、NaCl の濃度勾配溶出画分を調製したが、この画分には抗 FLAG-tag 抗体で検出される分子は確認されなかった。

10

(抗体の調製)

新規 PLA₁ の C 末端の 18 個のアミノ酸配列 [配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 434 (Met) から 451 (Leu) まで] を有するペプチドを KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させたものを抗原として用い、フロイントの完全アジュvantと共にラット (WYK 種) の後足蹠へ投与して免疫した。免疫したラットのリンパ節細胞をマウスのミエローマ細胞 (PAI) と融合させて融合細胞を得、その中から抗体分泌細胞を、ELI

S A、細胞蛍光法、およびウエスタンブロッティングによるスクリーニングで常法に従い選別した。新規 P L A₁に対する抗体は、該選別された融合細胞を常法に従って培養して得た。

5 (発現組織の確認)

新規 P L A₁の発現組織を調べる目的で、ヒト正常組織に対してノザンブロッティングを行った。オープンリーディングフレーム内の c D N A 断片である約 0.7 k b p の P C R 断片をプローブとして用いた。すなわち、P C R プライマーとして、配列表の配列番号 7 に記載の C T G C G C A C A A A C C A T C A A C T C C T C (フォワードプライマー配列) および配列表の配列番号 8 に記載の A G G G G A C A G G A C T C T T T T G T G A C (リバースプライマー配列) の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドを合成し、P C R をおこなうことにより³² P 標識プローブを調製した。ノザンブロッティングは、H u m a n M u l t i p l e T i s s u e N o t h e r n B l o t (C l o n t e c h) を用いてユーザーマニュアル (P T 1 2 0 0 - 1、C l o n t e c h) に従って実施した。その結果、正常組織においては、肺、腎臓、胰臓、前立腺、睾丸、卵巣、結腸において m R N A の発現が認められた (図 7 A)。

また、いくつかのヒト卵巣癌細胞株 (O v c a r - 3、O v c a r - 5、および O v c a r - 8) においても、ノザンブロッティング法により新規 P L A₁の m R N A が発現していることを見出した。さらに上記卵巣癌細胞株について、本発明の新規 P L A₁ (s P A - P L A₁) に対する上記モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング分析を行ったところ、分子量 5 5 k D a と 5 2 k D a の 2 つのバンドが検出され、新規 P L A₁蛋白質がこれら細胞株 (O v c a r - 3、O v c a r - 5、および O v c a r - 8) で発現されていることが明らかになった (図 8)。2 つの異なった分子量のバンドは、新規 P L A₁の糖鎖修飾の差異による。新規 P L A₁は、その殆どが卵巣癌細胞株の細胞画分から回収され、細胞上清からは得られなかった。また、新規 P L A₁はヒトの血小板においても

高い発現がみられた(図8)。血小板においても2つのバンドが検出されたが、その分子量は卵巣癌細胞で認められたものより少し小さかった。

さらに、卵巣癌細胞株における新規PLA₁の細胞内局在性を、上記新規PLA₁モノクローナル抗体を用いて免疫蛍光法で調べた。まず、卵巣癌細胞株(Ovcar-3、Ovcar-5、およびOvcar-8)を5%CO₂雰囲気下で5%の牛胎児血清(FCS)を含むDulbeccoの修正イーグル培地(DMEM)で培養した。カバーグラス上に増殖させた細胞は氷冷メタノールで固定し、10%ヤギ血清でブロックした。これを新規PLA₁に対する抗体または抗カベオリン(caveolin)1抗体(Santa Cruz Biotech社製)とインキュベーションし、続いて第2抗体であるラットまたはウサギの抗Ig抗体(Alexa488/greenまたはAlexa594/redを結合)とさらにインキュベーションし、新規PLA₁に対する抗体と抗カベオリン1抗体とにより二重染色した。新規PLA₁またはカベオリンが存在する細胞内領域は蛍光マイクロスコープ(Zeiss、Germany)により検出した。その結果、新規PLA₁は、細胞表面上の微小領域(microdomain)に局在することが知られるカベオリン1と同じ領域に局在することが判明した。また、Ovcar-5細胞では、新規PLA₁が斑点状分布を示した。

(基質特異性の検討)

上記の、組換え型バキュロウイルスを感染させたSf9細胞から精製した新規PLA₁を用いて、脂肪酸が[¹⁴C]で放射標識されたホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)、またはトリアシルグリセロール(TG)を基質とし、ホスホリパーゼ活性およびリパーゼ活性を測定した(J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。ホスホリパーゼ活性(PA、PS、PC)は、40μMのそれぞれの基質を、100mM Tris-HCl(pH7.5)、4mM CaCl₂存在下、酵素とともに37°Cで1時間インキュベーションし、遊離した放射性同位体標識脂肪酸

をドール法により抽出し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。リパーゼ活性（TG）は、40 μMの基質を100 mM Tris-HCl（pH 7.5）、4 mM CaCl₂存在下、酵素とともに37°Cで1時間インキュベーションし、遊離した放射性同位体標識脂肪酸をドール法により抽出し、5 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、新規PLA₁には、PAおよびPSを切断するホスホリパーゼ活性が検出された。TGを切10 断するリパーゼ活性、PCまたはPEに対するホスホリパーゼ活性に関しては有意な活性は検出されなかった。PAを切断するホスホリパーゼ活性は、野生型バキュロウイルス（wild type baculovirus）を感染させたSf9細胞培養上清から同様に精製した画分には検出されなかった。以上の検討により、新規PLA₁は、PAを加水分解し、細胞の分化および／または増殖を促進する成長因子であるリゾホスファチジン酸（LPA）の生成過程に関する可能性があることが示唆された。

.5 (PS-PLA₁との比較)

表1に、本発明の新規PLA₁と既知のヒト由来ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA₁（PS-PLA₁）との性状を比較して示した。本発明の新規PLA₁はPS-PLA₁と比較して、ヘパリンに対して高い親和性を示し、そのほとんどが細胞結合性の糖蛋白質であった。

10

表1

	Lid	ヘパリン 親和性	臓器分布	細胞内分布	基質特異性
PS-PLA ₁ (456 a.a.)	12 a.a.	低	様々な臓器 (inducible)	分泌性 細胞結合性	PS lysoPS
新規PLA ₁ (451 a.a.)	12 a.a.	高	様々な臓器	細胞結合性 分泌性	PA PS

(LPA受容体との関係)

本発明の新規PLA₁は、PAに作用して加水分解し、2-アシルLPAを產生する。従って、新規PLA₁は、生体内での機能として、LPAを生産してLPA受容体にリガンドとして供給している可能性がある。LPA受容体は、EDG2、EDG4、およびEDG7が知られているが、中でもEDG7は、不飽和脂肪酸を含むLPAに対し強い反応性を示し、1-acyl-LPAより2-acyl-LPAに強く反応するユニークな受容体であり、そのリガンド特異性はEDG2、EDG4とは異なる (J. Biol. Chem., 274, pp 27776-27785, 1999)。EDG7を介するシグナル伝達には何らかのPLA₁反応が関与することが予想されるので、新規PLA₁とEDG7の生体組織における発現をノザンプロッティング法により調べたところ、両方のmRNAが臍臓、前立腺、精巣と共によく発現しており、比較的良く似た組織分布を示した(図7A、BおよびC)。また、上記したように、新規PLA₁の発現が認められた卵巣癌細胞株および血小板では、LPAの存在も報告されている。

次に、新規PLA₁がPAを加水分解してLPAを產生し、EDG7にリガンドとして供給する可能性について検討した。まず、部分精製した本発明の新規PLA₁をEDG7発現細胞に添加したが細胞応答は観察されなかった。そこで、図9に示すバイオアッセイ系を用いて、LPAが新規PLA₁によって生産され得るか検討をおこなった。バイオアッセイ系には、LPAへの反応性を欠く昆虫細胞Sf9を使用した。Sf9細胞に、新規PLA₁を上記のバキュロウイルス系を用いて発現させた(以下、酵素側と呼ぶこともある)。また、LPA受容体であるEDG7を、J. Biol. Chem., 274, pp 27776-27785, 1999に記載の方法に準じてバキュロウイルス系を用いてSf9細胞に発現させた(以下、受容体側と呼ぶこともある)。この系においては、新規PLA₁が十分に発現されてLPAが產生されれば、LPA受容体を発現している細胞にLPAが結合して細胞内シグナル伝達が惹起され、カルシウムイオン(Ca²⁺)の細胞内濃度が上昇する。すなわち、新規PLA₁のin vitroでのLPA

A産生とその作用を、Ca²⁺の濃度変化を検出することにより、検討することができる。Ca²⁺濃度変化の測定は、Ca²⁺蛍光指示薬Fura-2を用いて行った。まず、LPA受容体を発現させたSf9細胞をSf9カルシウムアッセイ用栄養液(10 mM CaCl₂, 60 mM KCl, 17 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM MES, 4 mM グルコース, 110 mM シュークロース, 0.1%ウシ血清アルブミン)に5×10⁵細胞/mlとなるように懸濁し、2 μM Fura2-AMを27°Cで1時間取り込ませた。その後、上記栄養液で2回洗浄後、上記栄養液中に5×10⁵細胞/mlとなるように懸濁した。新規PLA₁を発現させたSf9細胞は、上記栄養液に5×10⁵細胞/50 μlとなるように懸濁した。キュベット中に上記で調製したLPA受容体発現細胞を1 ml加え、マイクロスターラーで攪拌しながら340 nmおよび380 nmの励起光をあて、それぞれの500 nmでの蛍光強度とその比を、CAF-110型細胞内イオン測定装置(日本分光工業株式会社)により測定した。これに新規PLA₁発現細胞を50 μl加えて同様に測定を行った。また、それぞれの測定時に、トリトン-X100を添加して全Fura2と細胞外Ca²⁺が結合した時の値と、EGTAを加えて全Ca²⁺がキレートされてFura2が解離した時の値を同様に測定した。上記各測定値を用いて、下記式により、細胞内カルシウム濃度を算出した。

$$[Ca^{2+}] (nM) = 224 \times b / a \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

上記式において、224はFura2の解離定数、aはトリトンX-100を加えて全Fura2と細胞外Ca²⁺が結合した時の380 nm励起光による蛍光強度、bはEGTAを加え全Ca²⁺がキレートされてFura2が解離した時の380 nm励起光による蛍光強度、Fは340 nm励起光による蛍光強度/380 nm励起光による蛍光強度の比、F_{max}はトリトンX-100を加えて全Fura2と細胞外Ca²⁺が結合した時のF、F_{min}はEGTAを加え全Ca²⁺がキレートされてFura2が解離したときの

Fである。

その結果、EDG 7を発現させたSF 9細胞に、新規PLA₁発現細胞を加えると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された(図10a)。この現象は、受容体側(図10b)または酵素側(図10e)を野生型バキュロウイルスで感染させた細胞に変えた場合には観察されなかった。Fura 2が受容体側細胞に取り込まれていることは、細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺を放出させるタブシガージンを用いて確認した(図10b)。また、このCa²⁺細胞内濃度の上昇は、LPA(100nMの1-oleyl)により一時的にCa²⁺濃度を上昇(図10c)させた後では、新規PLA₁発現細胞を加えてもみられず、脱感作を受ける(図10d)ことが判った。このことは、観察されたCa²⁺の上昇が、EDG 7によって媒介されていることが示唆する。このEDG 7発現細胞の細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、他のホスホリパーゼ(sPLA₂-IIA(secretory phospholipase type IIA)またはPS-PLA₁]を発現させた細胞では誘導できない(図10e)ことから、新規PLA₁に特異的な現象である。また新規PLA₁発現細胞の培養上清は、なんら検知できるCa²⁺反応を誘導せず(図10a)、生産されたLPAは殆ど細胞と会合していることが判明した。さらに、新規PLA₁の酵素活性中心であり、ほとんど全てのリパーゼ/PLA₁ファミリーで保存されているセリン残基[配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列154(Ser)]をアラニン残基に置換した新規PLA₁変異体発現細胞は、EDG 7発現細胞のCa²⁺濃度の上昇を誘導しなかった(図10f)。以上のことから、新規PLA₁は細胞内で内在性のPAを基質として加水分解してLPAを產生し、LPA受容体であるEDG 7を発現している細胞に作用していることが証明された。また、產生されたLPAは細胞膜中に存在していることが示唆された。かくして、新規PLA₁による細胞内LPA产生と、LPA受容体であるEDG 7への細胞膜に存在するLPAの受け渡し機構が本発明により確認され、PLA₁ファミリーの生理的意義、およびその作用機序を明らかにする手がかり

を提供した。

(新規PLA₁が媒介するLPA産生におけるPLDの関与)

膜リン脂質をPAに変換するホスホリパーゼD(PLD)は、卵巣癌細胞によるLPA産生においても関与している。新規PLA₁によるLPA産生におけるPLDの役割を見出すために、プロテインキナーゼC α を介してPLD₁を活性化するPMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)、およびPLDの全てのアイソフォームを阻害する短鎖アルコール(short-chain alcohols)を使用した。新規PLA₁発現細胞とEGD7発現細胞は上記同様のものを用いた。まず、PMA存在下で新規PLA₁発現細胞をインキュベーションし、EGD7発現細胞からのカルシウム放出を誘導し得るか検討した。図11AおよびDに示すように、100nMのPMAで細胞を30分間処理することにより、有意に新規PLA₁発現細胞の添加による細胞内Ca²⁺濃度上昇を促進した。また、PLD活性を完全に阻害し得る濃度である0.5%1-ブタノール存在下では、新規PLA₁発現細胞のCa²⁺濃度上昇のPMA処理による促進は完全に阻害された(図11BおよびE)。一方、0.5%2-ブタノールは、何ら影響しなかった(図13CおよびF)。2-ブタノールは、PLDを阻害しないことから、新規PLA₁によるLPA産生はSf9細胞においてはPLD依存的(PLD-dependent)であるといえる。PMA、1-ブタノールまたは2-ブタノール単独では、細胞内Ca²⁺濃度に何ら影響しなかった。また、他のホスホリパーゼ、PS-PLA₁またはsPLA₂-IIaを発現させたSf9細胞をPMA処理しても、EDG7発現細胞において何ら検知できるCa²⁺反応を誘導されなかった。すなわち、新規PLA₁はLPA(おそらく2-acyl-1-lysophosphatidylcholine)をPLDの活性化との協同作用により産生するものと結論付けた。

(アンチセンスオリゴの調製)

ヌクレオチド配列 G A A T A A G T A G A A T C T C A A C A T A T G G (配列番号 2 の塩基番号 85 の C (cytosine) ~ 109 の C (cytosine))までの開始コドンを含む領域に対する相補鎖) を有するホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを株式会社サワディーテクノロジーに委託して合成した。

5

(全長アンチセンス (相補鎖) 発現ベクターの作製)

新規 PLA₁をコードするDNAを含有するプラスミドであるBlue script SK-P A - PLA1 (上記実施例の新規配列のクローニングの項に記載したものと同一) を template DNAにしてPCR法にてcDNA断片を増幅し、制限酵素BamH IおよびNot Iで消化した。得られた約1.5 kbのDNA断片を発現用ベクターp cDNA 3の制限酵素BamH I - Not Iのサイトにライゲートし、全長のアンチセンス鎖 (相補鎖) を発現するベクターを作製した。

5 (PLA1 発現抑制試験)

新規 PLA₁を発現する細胞株Ovcar-3、Ovcar-5、Ovcar-8に上記で調製したアンチセンスオリゴおよび全長アンチセンス発現ベクターを、トランسفェクション試薬FuGene 6 (ロッシュ) を用いて使用説明書に従ってトランسفェクションした。対照として発現用ベクターp cDNA 3自身を用いた。72時間後に、細胞を回収し、通常の方法に従って、ウェスタンブロッティングを実施した。

産業上の利用の可能性

本発明は、PLA₁リパーゼファミリーに属する新規PLA₁を提供するものである。新規PLA₁はホスファチジン酸（PA）に対する基質特異性を有する細胞結合性の糖蛋白質であり、PAを加水分解してリゾホスファチジン酸（LPA）を產生させるものである。さらに本発明は、新規なPA特異的リパーゼ（PLA₁）による細胞におけるLPA产生と、LPA受容体であるEDG7への細胞からのLPAの受け渡し機構の存在を見出したことにより、PLA₁ファミリーの生理的意義、LPA受容体のリガンドを产生する機構を解明する手がかりを提供するものであり、この知見を利用した新規医薬組成物、診療手段の提供は、リパーゼ関連の臨床ならびに基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

請 求 の 範 囲

1. 下記の群より選ばれるポリペプチド；
 - ①配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、
 - 5 ②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、
 - ③前記①のポリペプチドと少なくとも約 70 % のアミノ酸配列上の相同性を有しあつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、
 - および
 - ④前記アミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の、少なくとも約 8 個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。
3. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
4. 請求の範囲第 3 項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。
5. 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列またはその相補的配列の、少なくとも約 15 個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド。
- 10 6. 請求の範囲第 3 項ないし第 5 項に記載の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
7. 請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
8. 請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドの製造方法。
- 15 9. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチド

を免疫学的に認識する抗体。

10. ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、請求の範囲第9項に記載の抗体。

11. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および／または請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第1項または第2項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第3項ないし第5項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第6項に記載のベクター、請求の範囲第7項に記載の形質転換体、請求の範囲第9項もしくは第10項に記載の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法。

12. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。

13. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻

害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、請求の範囲第7項に記載の形質転換体と、該形質転換体中で発現される請求の範囲第1項に記載のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。

14. 請求の範囲第11項ないし第13項に記載の方法で同定される化合物。

15. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物。

16. 請求の範囲第1項または第2項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第3項ないし第5項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第6項に記載のベクター、請求の範囲第7項に記載の形質転換体、請求の範囲第9項もしくは第10項に記載の抗体、または請求の範囲第14項または第15項に記載の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物。

17. 個体における請求の範囲第1項に記載のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病的診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペ

プチドをマーカーとして分析することを含む方法。

18. 請求の範囲第16項に記載の医薬組成物をホスホリパーゼA₁に関する疾患に用いることを特徴とする治療方法。

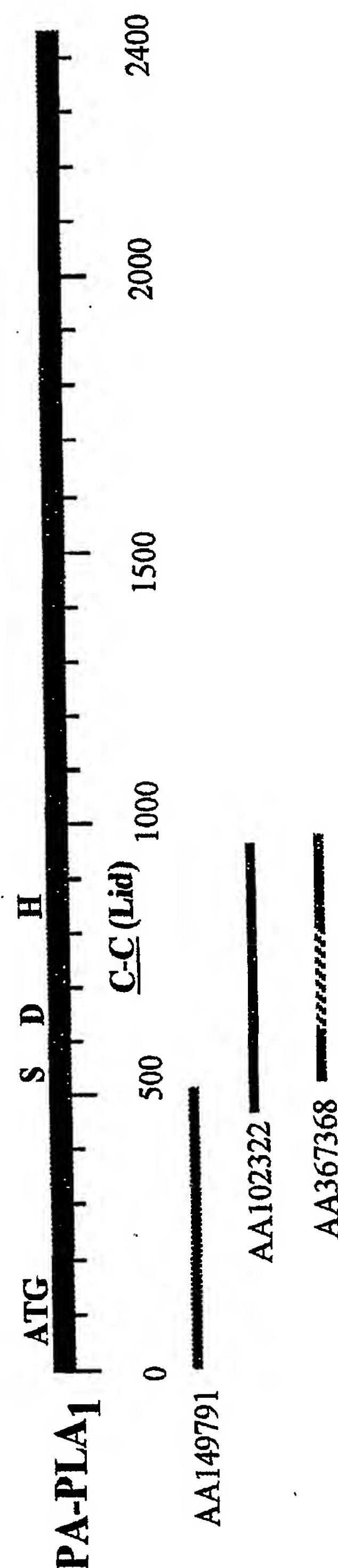
19. 請求の範囲第16項に記載の医薬組成物の製造方法。

1/15

図面

図 1

新規リバーサル塩基配列・EST塩基配列関係図



2/15

图 2

GAATTGG

CACGAGAAAA TCCCACAGTG GAAACTCTTA AGCCTCTGCG AAGTAAATCA TTCTTGTGAA
 TGTGACACAC GATCTCTCCA GTTTCCATAT GTTGAGATTG TACTTATTCA TCAGTTGTT
 M L R F Y L F I S L L
 GTGCTTGTCA AGATCAGACG CAGAAGAAC ATGTCCTTCA TTCACCAGGC TGAGCTTCA
 C L S R S D A E E T C P S F T R L S F H
 CAGTGCAGTG GTTGGTACGG GACTAAATGT GAGGCTGATG CTCTACACAA GGAAAAACCT
 S A V V G T G L N V R L M L Y T R K N L
 GACCTGCGCA CAAACCATCA ACTCCTCAGC TTTTGGGAAC TTGAATGTGA CCAAGAAAAC
 T C A Q T I N S S A F G N L N V T K K T
 CACCTTCATT GTCCATGGAT TCAGGCCAAC AGGCTCCCCCT CCTGTTGGA TGGATGACTT
 T F I V H G F R P T G S P P V W M D D L
 AGTAAAGGGT TTGCTCTCTG TTGAAGACAT GAACGTAGTT GTTGGTGTGATT GGAATCGAGG
 V K G L L S V E D M N V V V V D W N R G
 AGCTACAAC TTAATATATA CCCATGCCTC TAGTAAGACC AGAAAAGTAG CCATGGTCTT
 A T T L I Y T H A S S K T R K V A M V L
 GAAGGAATT ATTGACCAGA TGTTGGCAGA AGGAGCTTCT CTTGATGACA TTTACATGAT
 K E F I D Q M L A E G A S L D D I Y M I
 CGGAGTAAGT CTAGGAGCCC ACATATCTGG GTTTGGTGGAG GAGATGTACG ATGGATGGCT
 G V S L G A H I S G F V G E M Y D G W L
 GGGGAGAATT ACAGGCCTCG ACCCTGCAGG CCCTTATTTC AACGGAAAC CTCACCAAGA
 G R I T G L R P A G P L F N G K P H Q D
 CAGATTAGAT CCCAGTGTGATG CGCAGTTGT TGATGTCATC CATTCCGACA CTGATGCACT
 R L D P S D A Q F V D V I H S D T D A L
 GGGCTACAAG GAGCCATTAG GAAACATAGA CTTCTACCCA AATGGAGGAT TGGATCAACC
 G Y K E P L G N I D F Y P N G G L D Q P
 TGGCTGCCCG AAAACAATAT TGGGAGGATT TCAGTATTT AAATGTGACC ACCAGAGGTC
 G C P K T I L G G F Q Y F K C D Q R S
 TGTATACCTG TACCTGTCTT CCCTGAGAGA GAGCTGCACC ATCACTGCCT ATCCCTGTGA
 V Y L Y L S S L R E S C T I T A Y P C D
 CTCCTACCAAG GATTATAGGA ATGGCAAGTG TGTCAAGCTGC GGCACGTCAC AAAAAGAGTC
 S Y Q D Y R N G K C V S C G T S Q K E S
 CTGTCCCCTT CTGGGCTATT ATGCTGATAA TTGGAAAGAC CATCTAAGGG GGAAAGATCC
 C P L L G Y Y A D N W K D H L R G K D P
 TCCAATGACG AAGGCATTCT TTGACACAGC TGAGGAGAGC CCATTCTGCA TGTATCATTA
 P M T K A F F D T A E E S P F C M Y H Y
 CTTTGTGGAT ATTATAACAT GGAACAAAGAA TGTAAGAAGA GGGACATTA CCATCAAATT
 F V D I I T W N K N V R R G D I T I K L
 GAGAGACAAA GCTGGAAACA CCACAGAAC CAAATCAAT CATGAACCCA CCACATTTCA
 R D K A G N T T E S K I N H E P T T F Q
 GAAATATCAC CAAGTGTGAGTC TACTTGCAAG ATTTAATCAA GATCTGGATA AAGTGGCTGC
 K Y H Q V S L L A R F N Q D L D K V A A
 AATTCCTTG ATGTTCTCTA CAGGATCTCT AATAGGCCCA AGGTACAAGC TCAGGATTCT
 I S L M F S T G S L I G P R Y K L R I L
 CCGAATGAAG TTAAGGTCCC TTGCCATCC GGAGAGGCC CAGCTGTGTC GGTATGATCT
 R M K L R S L A H P E R P Q L C R Y D L
 TGTCCCTGATG GAAAACGTTG AACAGTCTT CCAACCTATT CTTGCCAG AGTTGCAGTT
 V L M E N V E T V F Q P I L C P E L Q L
 GTAACGTTG CCAGGACACA TGGCCATAAA TAATAGAAAG AAAGCTACAA CCACAGGCTG
 *

3/15

図 2 つづき

TTTGAAAGCT TCACCTCACC TTTCTGCAAA GCAGAAAAAG TATGAAAAAA CCAAGGCTTT
TTTCAGTAGC GTCCTATGGA TGTACACATTG TACATCAAAC AACCTTGTGA TTATAAAACG
ATCCTGGGAA GGAGCCCCTA ACTAGGGCAA GTCAGAAATA GCCAGGCTCG CAGCAGCGCA
GCGCTGTGTC TGCTGTGTCC TGGGGCCTCC CTTGTTCCGA CCTGTCAATT CTGCTGCCTG
TCACCGGGGT GGTTCTGCCCT CGGGTCAAGC ATCTTCAAGG GAAGGACGGA
CTGGAGGCCT CACCGTGGAC TCAACTCTGC ATTCTCCGTG CCACATTCCCT CCAGTTCCCA
CACGTAGAAC GGAACGAAAC TGACGTCTAC CTCATGGGGC TGCTGTGTGG GTTTGGGAGG
AAAAAAATCTA TGAAGGGTTT TTTGAAATCC CATAGGTGCC ACATCTATGA GATGTTTGAT
AAATGTGAAT ATGCTTTAC ATTTGGGCTT ATCTAATTG CAATAAGAGA GCCTCTCTCT
ATCAACACCA GCTTCTCTCT CGGGCTGTGTT GCTCAGGGAA GGCAAGAAAG CCACGTGCTG
GCCCTCTGCC TTCTCTAAAG TGCTGTGGA GCATGGAGGA GCTGGAGGAG ATGGGGATGG
ACTGACAGCT AAGAGGGCGG CTGCTGGGAC TAGATAGTGG ATGAAGAAAG AAGGACGAGG
AAGCCGTGGG GCAGCCTCTT CACATGGGGC CAGGGGATGG AGCATGAGGC AGGGGAAGGA
AAAGCAGAGC TTATTTTCA CCTAAGGTGG AGAAGGATCA CTTTACAGGC AACGCTCATT
TTAAGCAACC CTTAAGAAAT GTTTATGTGTT CTTTATTACC AATGTAATCT ATGATTATTG
AAGGAAATT AGAAAATGCG TAGATACAAA AAAAAAAA AAAAAGTCGA G

図 3

4/15

新規 PLA₁
 plrp₁
 plrp₂
 肝臓型リノペー^セ
 hPS-PLA₁
 ヒト臓型リノペー^セ
 リボプロテインリノペー^セ

1 : M-L-RF--YLEI-SL-LCLSRSDAEETCP-SFTR-LSFHSA-VV-GTGLNVRIMLYTRKN 50
 1 : MLI FWTLTLLFLGAAKGKEVCYEDLGCFSDTEPWGGTAIRPLKILLPWSPEKIGTRFLLYT 60
 1 : MLPPWTLGMLLLATVRGKEVCYQQLGCFSDEKPWAGTLQRPVKILLPWSPEDDIDTRFLLYT 60
 1 : MDTSPLCFSILLVICIFIOSSALGOSLKKPEPEGRRAQAVETNKTLHEMKTRFL-LFEGETN 59
 1 : MPPGPWESCFWVGGLILWLSVGSSGDAPPQPKCADFOSANLEEGTDLKVKQFLLFVPSN 60
 1 : MILPLWTLSL-LLGAVAGKEVCYERLGCFSDDSPWSGITERPLHILPWSPKDVNTRFLLYT 59
 1 : MESKAL-L-V-LTLAVWLIQSLSTA SRGGVAAA-DQRDFDIDESKF-ALRTP---E-DTAE 51

新規 PLA₁
 plrp₁
 plrp₂
 肝臓型リノペー^セ
 hPS-PLA₁
 ヒト臓型リノペー^セ
 リボプロテインリノペー^セ

51 : LTCAQOTIN-SSAF---GNLNVTKKTFIVHGERPTGSPPVWMDDLVKG---LSVEDMNV--- 103
 61 : NENPNNEQILLLSDPSTIEASNFQMDRKTRFLIHGEIDKGDESWVTDMCKKLFEVEEVNC 120
 61 : NENPNNEQLLITGTEPDTEASNFQLDRKTRFLIHGEIDKAEDSWPSDMCKKMFEVEKVNC 120
 60 : QGCQIRINHPDTLOECGENSSLPLVMTIHGWSVDPVLENWIWQMVAAL--KSOPAQPVNV 117
 61 : PSCGQOLVEGSSDLQNSGENATLGTKLIIHGGERVLGKPSWIDTEIRTTL--LRATNANV-- 116
 60 : NENPNNEQE-VAADSSSISGSNFKTNRKTRFLIHGEIDKGEENWLANKNLFKVESVNC 118
 52 : DTCHLIPGVAESVATCHNFNHSSSKTFMVTHGWTVTGMYESSWVPKLVAAL--YKREPDSD-NV 108

104 : VVVDWNRGATTLYTHASSKTRKVAMVILKEEIDQMLAEGASLDDIYMIGVSLGAHISGFV 163
 121 : ICVDWKKGSOATYTQAANNVRVVGAOVAQMLDILLTEYSYPSSKVKHIGHLGGAHVAGEA 180
 121 : ICVDWRHGSRAMYTQAVONIRVVGAEATAFLIQALSTOLGYSILEDVHVIGHSLGAHTAAEA 180
 118 : GLVDWITLAHDHYTIAVRNTRLVGKEVAALLRWLEESVQLSRSHVHLIGYSLGAHVSGFA 177
 117 : IAVDWIYGSTG-VYFSAVKNNVIKLSLEISLFLNKLLVLYSESSIHIIIGVSLGAHVGMV 175
 119 : ICVDWKGGSRRTGYTQASONIRIVGAEVAYFVEFQSAEGYSPSNVHVIGHSLGAHAAGEA 178
 109 : IVWDWLSRAQEHYPPVSAGYTKLVGQDVAREFINWMEEEFNYPIDNVHILLGYSLGHAAGIA 168

164 : G---EMYDGWLGRITGLDPAGPLFNGKPHQDRJLDPSDAQFVDIHSD-----TDALGYKE 215
 181 : G---SKTPG-LSRITGLDPVEASEFESTPEEVRLDPSDADFDVDFVIAHTDAAPLIPFLGEGTNQ 237
 181 : G---RRLGGRVGRITGLDPAGPCEQDEPEEVRLDPSDAVFVDFVIAHTDSSSPIVPSLGEQMSQ 238
 178 : GSSIIGGTHKIGRITGLDAAGPLFEGSAPSNNRLSPDDANFVDAIHT-FTREHMGLSVGIKQ 236
 176 : G---QLFGGQLGQITGLDPAGPEYTRASVEERLDAGDALFVEAIHT-----TDNLGIRI 227
 179 : G---RRTNGTIGRITGLDPAEPCFOGTPELVRLDPSDAKEFVDFVIAHTDCAPIVPNLGEQMSQ 236
 169 : G-SL-TNKKVNRITGLDPAGPNEEYAEAPSRLSPDDADFDVDFVLT-FTRGSPGRSIGIQQ 225

216 : PLGNITIDFYPNGGLDQPGC-----PKTILGG-----EQYEKCDHQR-SVYLILSSIRESC 263
 238 : QMGHILDDEFPNGGE.SMPGCKKKNALSQIVDLDGIMAGTRDFVACNHLRSYKYYLESIINPDG 297
 239 : KVGHILDDEFPNGGKEMPGCKKKNVLSTITIDGIGWEIGGFVSCNNHLRSFEYYSSSSVLNPDG 298
 237 : PIGHYDYPNGGSEOPGCHSLELYRHIAQHG-FNAITQTICKSHERSVHLEIDSLLHAGT 295
 228 : PVGHVVDYFVNNGGQDQPGC-----PTFFYAG-----YSYLICDHMR-AVHLYISALENSC 275
 237 : VVGHILDDEFPNGGVEMPQGCKKKNILLSQIVDIDGIGWEGRDAACNHLRSYKYYTDSTVNPDG 296
 226 : PVGHVVDIYPNGGTFOQPGCNIGEAIRVIAERG-LGDVDQLVKCSHERSITHLFDSLLNEEN 284

新規 PLA₁
 plrp₁
 plrp₂
 肝臓型リノペー^セ
 hPS-PLA₁
 ヒト臓型リノペー^セ
 リボプロテインリノペー^セ

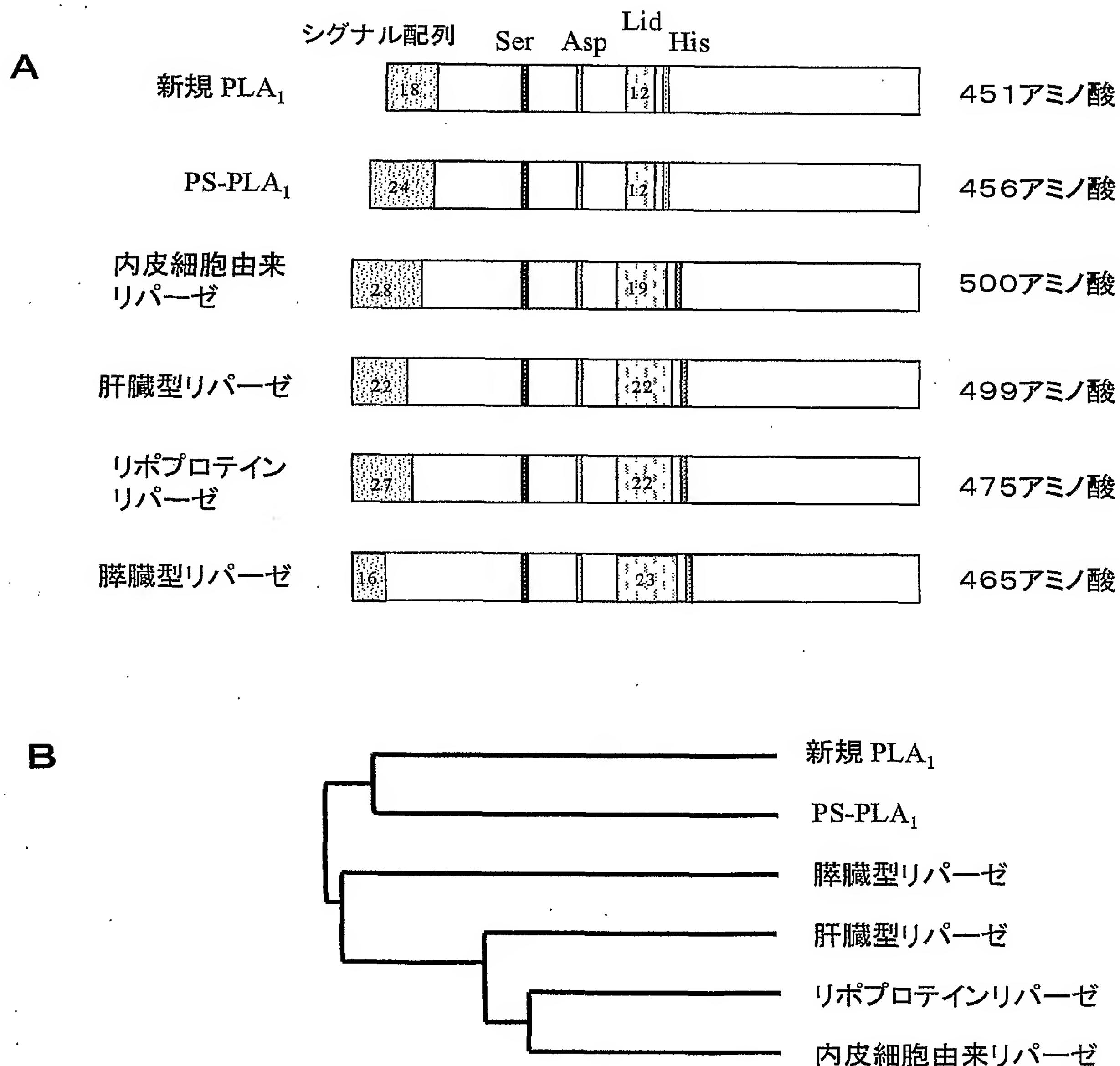
図 3 う し う づ

5/15

新規 PLA ₁	264 : TITAYPCDSYQDYRNGKCVSCCGTSQKESCPILLGGYYADNWKDKDPPMKTAKFFDTAEE	323
plrp1	298 : F-AAYPCSYKSFESDKCEPCPDQGCPOMGHYADKEAGRTEQQKEFLNTGEASNEARW	356
plrp2	299 : F-LGYPYCASYDEFQESKCFPCPAEGCPKMQEKGKTSQEVTFELNTGESGNFTSW	357
肝臓型リバーゼ	296 : QSMAYPCGDMNSFSQGLCISCKKGRCNLGSCKKGRNLG-YHVROEPRSKSCLRFLYTRAQSPFKVYHY	354
hPS-PLA ₁	276 : PLMAEPCASYKAFLAGRCIDCENPFLSCPRLVEQG-GVKI-EPLPKEVKVYLTTSS	333
ヒト腎臓型リバーゼ	297 : F-AGEPCASYNVFTANKCFCPCPSGGCPQMGHYADRYPGKTNDVGQKEYLDTGDA\$NEARW	355
リボプロテインリバーゼ	285 : PSKAYRCSSKEAFAEKGLCISCRKNRCNNLGSCKKGRNLSQMPYKVYHY	343
新規 PLA ₁	324 : SPFCMYHYFVDLIITWNKNVRGDTITIKLRDKAGNTTESKINHEPTTEQKYHQVSLLAREN	383
plrp1	357 : RYGV\$-ITLSG-SIRGILKPGSTHISYEFDAKLDVGTI	413
plrp2	358 : RYKVS-VTLSGKEKVNGYIRIALYGSNENSQY-EIFKGSLKPDA\$HTCAIDDV\$ENVGKI	415
肝臓型リバーゼ	355 : QLKIQFI-NQETPIQTTFMSLIGTKEKMOKIPITLGKGIA\$NKTY\$FLITLDVDIGEL	413
hPS-	334 : APYCMHHSLVEFHKE\$RNKD\$TNIEVT\$EL-SSNITSSSKIT-I\$PKQ-QRYGK-GIAHAAT	389
PLA ₁	356 : RYKVS-VTLSG-KKV\$GTLKPD\$THISNEFSDDVDGDL	412
リボプロテインリバーゼ	344 : QVKIHFGSGTESETHTNQAEFISLYGTVAESENTPFTL-PEVSTNKTY\$FLIYT\$EV\$DIGEL	402
新規 PLA ₁	384 : QDLDKVAASI\$IMESTGSLIGPRYKIRIL-RMKLRSLAHPERPOL-CRYDLV-LMENVETV	440
plrp1	414 : EKV\$FLWNN\$V\$INP'TLPKVGATKITVQKGEEKTVYNFCSED\$TVREDT\$LLT\$TP-C-----	467
plrp2	416 : QKV\$FLWNN\$KRG\$INL\$SEP\$KLIGASQITVQ\$GEGDGTEYNFCSSDT\$VEENVLQSLYP-C-----	469
肝臓型リバーゼ	414 : TMIKFKWENSAWWANV-WDTVQ\$TIPWSTGPRHSGLVLIKTI\$RKAGETOQRMTECS\$ENTD	472
hPS-PLA ₁	390 : PQ-COINOV\$KFOSSNRV\$KKDR\$TII\$GKFCTALLPVNDREKMVCCLPEPVNLQASVTVS	448
ヒト腎臓型リバーゼ	413 : QMV\$KFIWYN\$V\$INP'TLPRVGASKIIVETMVGKQ-ENFC\$P\$ET\$VREEVLLT\$TP-C-----	465
リボプロテインリバーゼ	403 : IMLKLKW\$KSDSYF-S--W-S-D---WWSSP---GEAIQKIRV\$KAGE\$QK\$VIFCSREKV	450
新規 PLA ₁	441 : EQ-PILCP\$EILQL-----	451
plrp1	468 : -----	468
plrp2	470 : -----	470
肝臓型リバーゼ	473 : DLLRP\$TOE\$KIFVKCEISKTSKRKIR	498
hPS-PLA ₁	449 : CDLKIA\$CV-----	456
ヒト腎臓型リバーゼ	466 : -----	466
リボプロテインリバーゼ	451 : SHI\$QKGKAPAVFVKCH-DK\$LINKSG	475

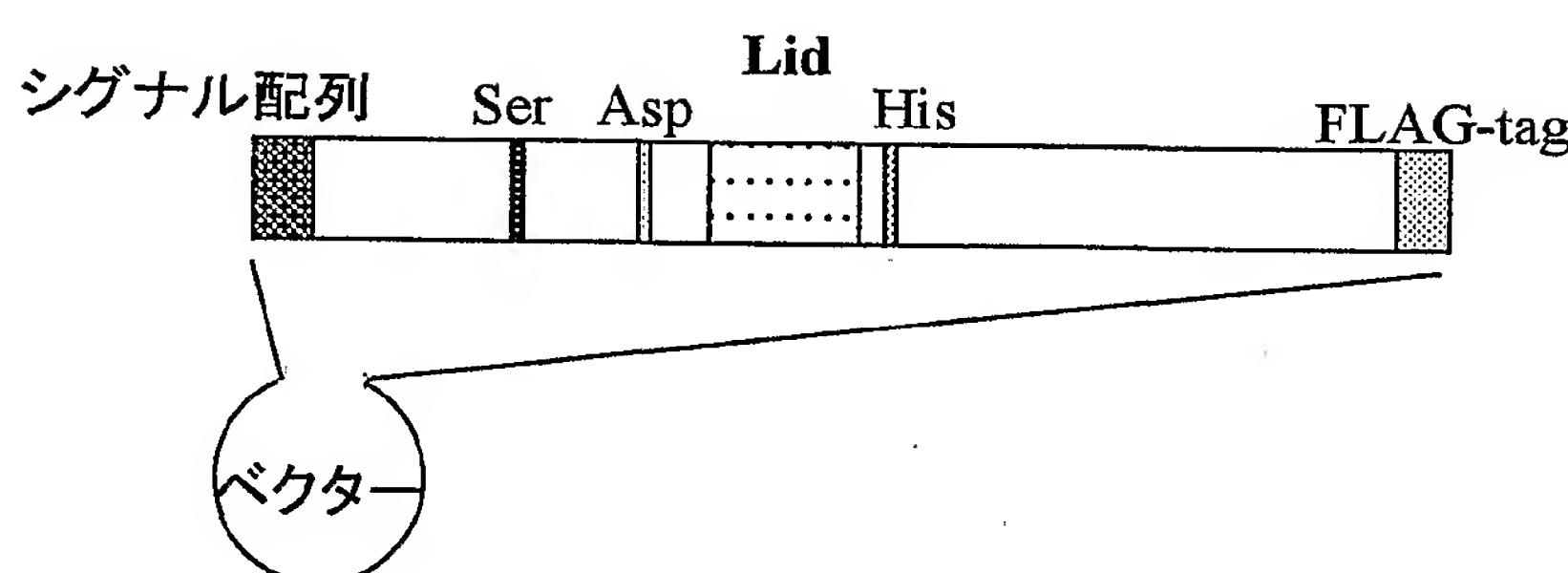
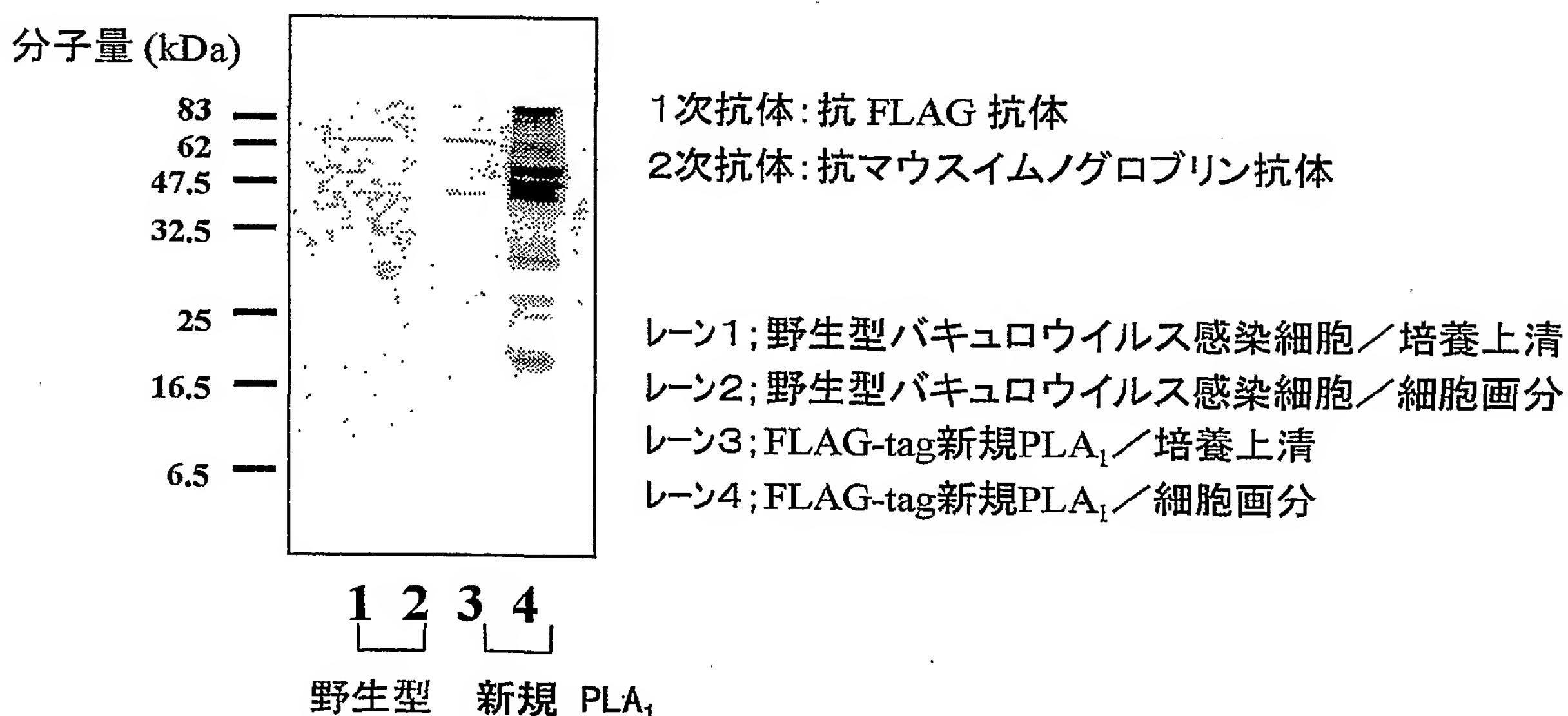
6/15

図 4



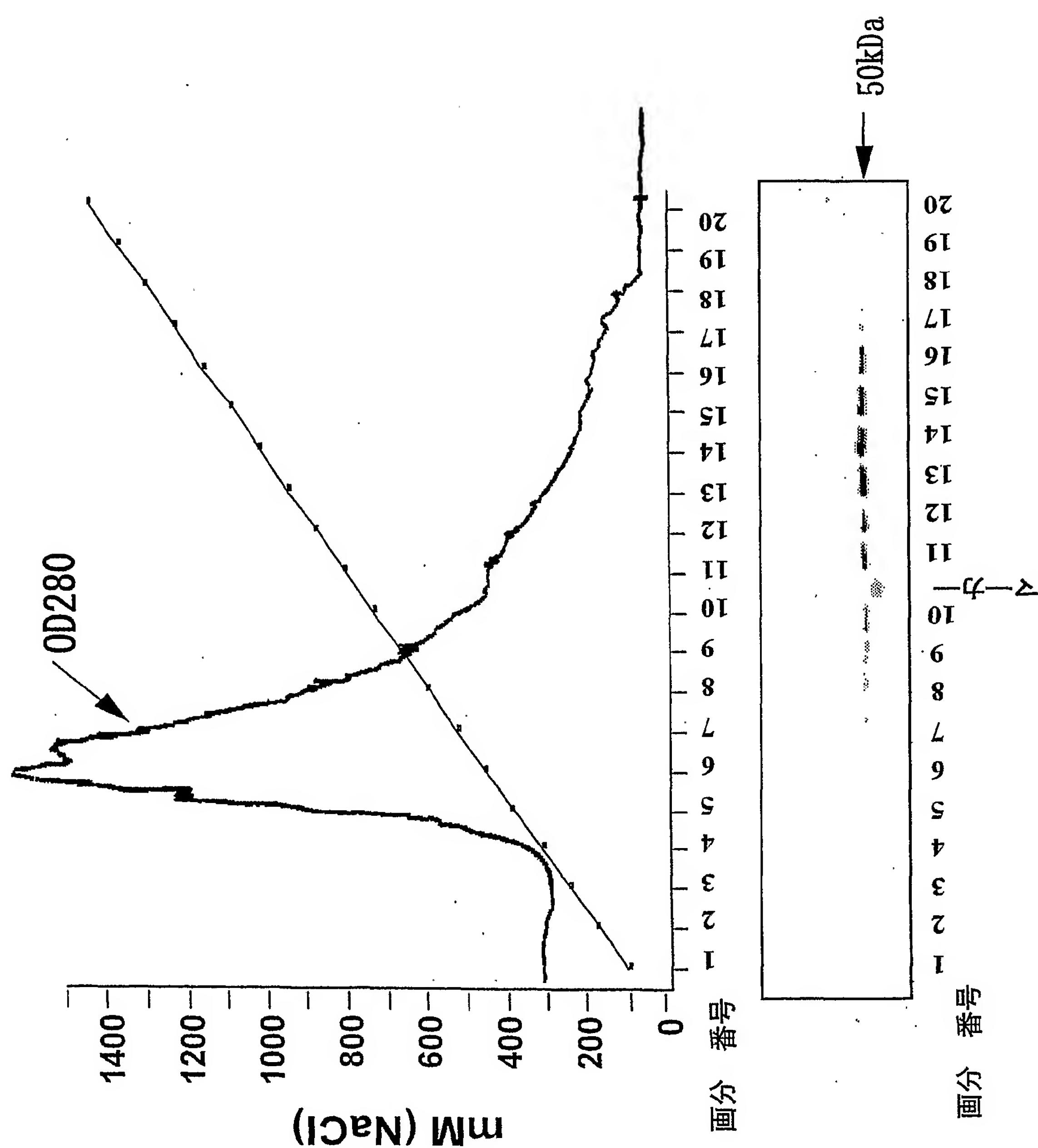
7/15

図 5

A**B**

8/15

図 6

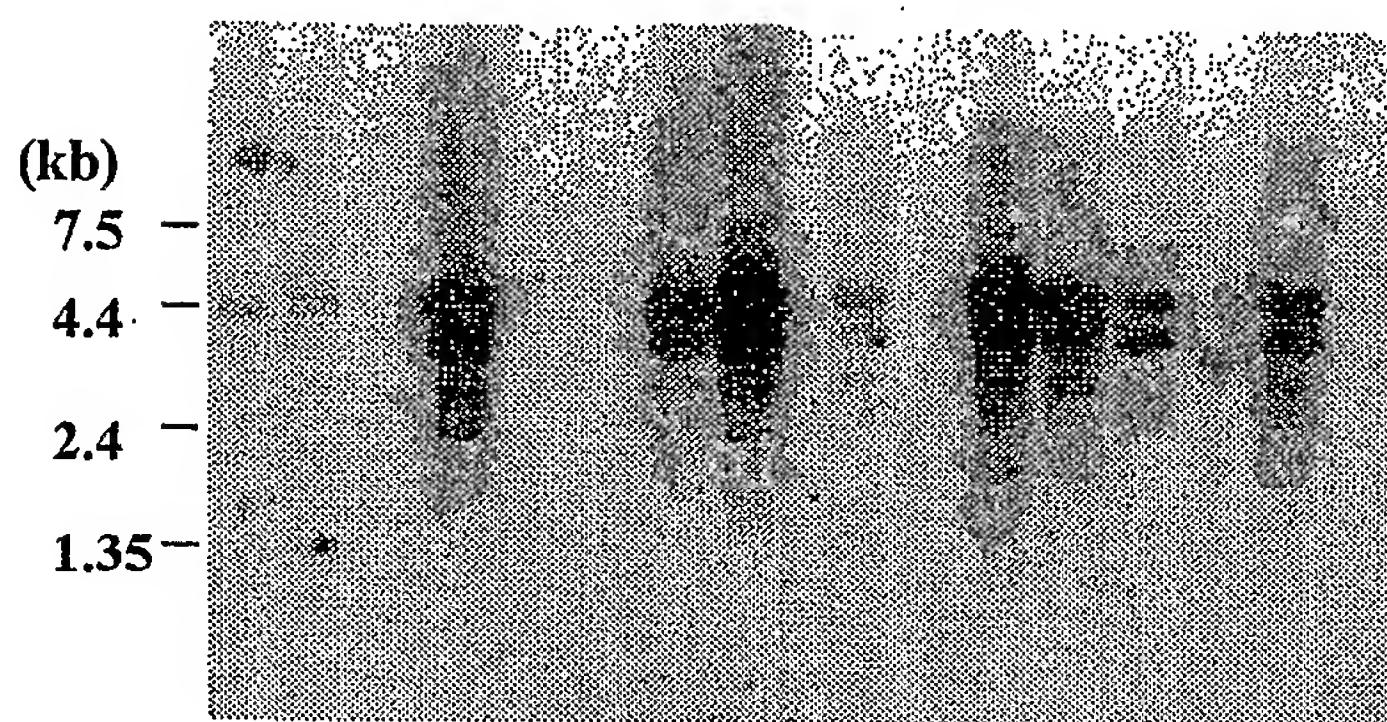
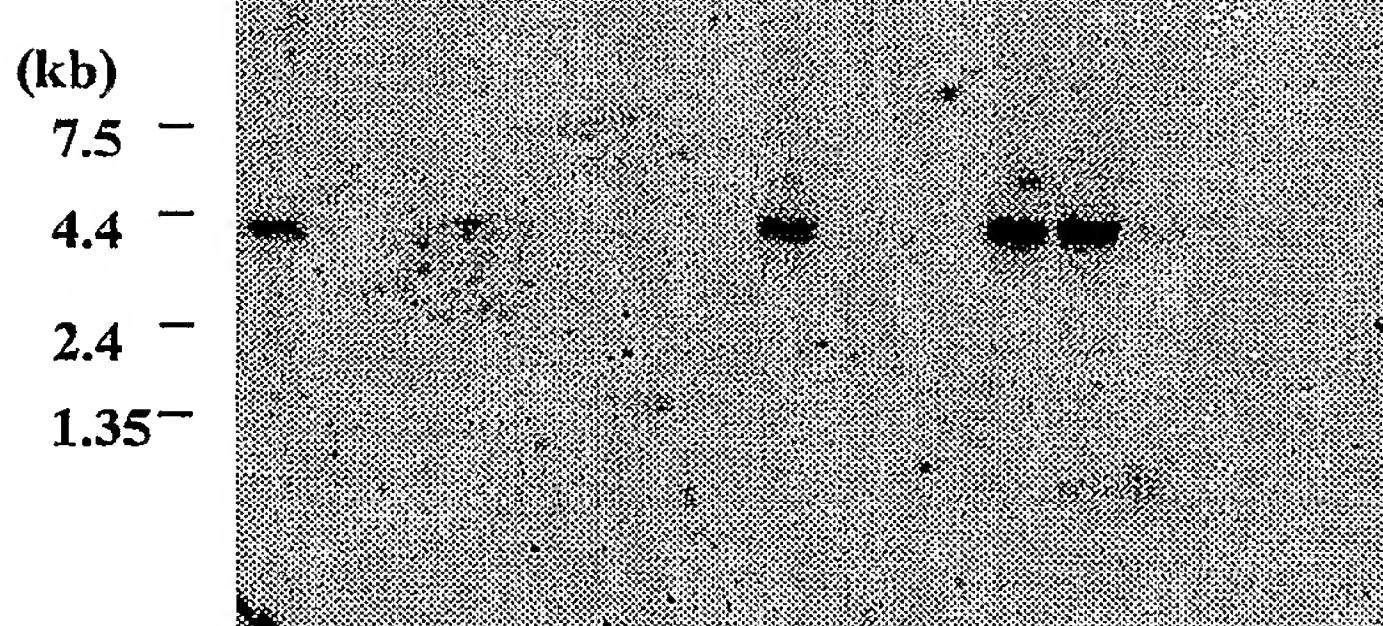
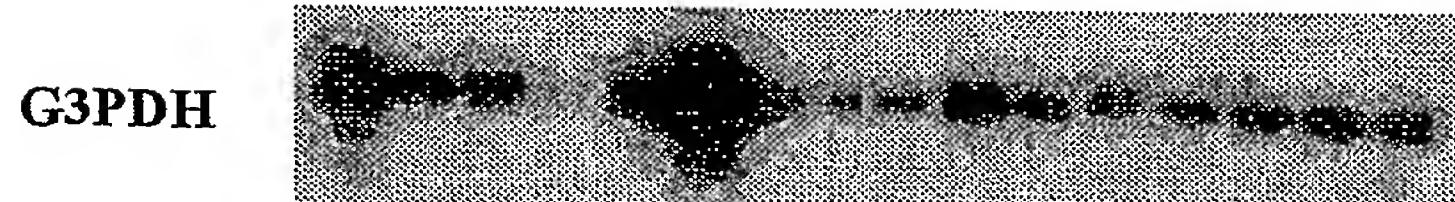


9/15

図 7

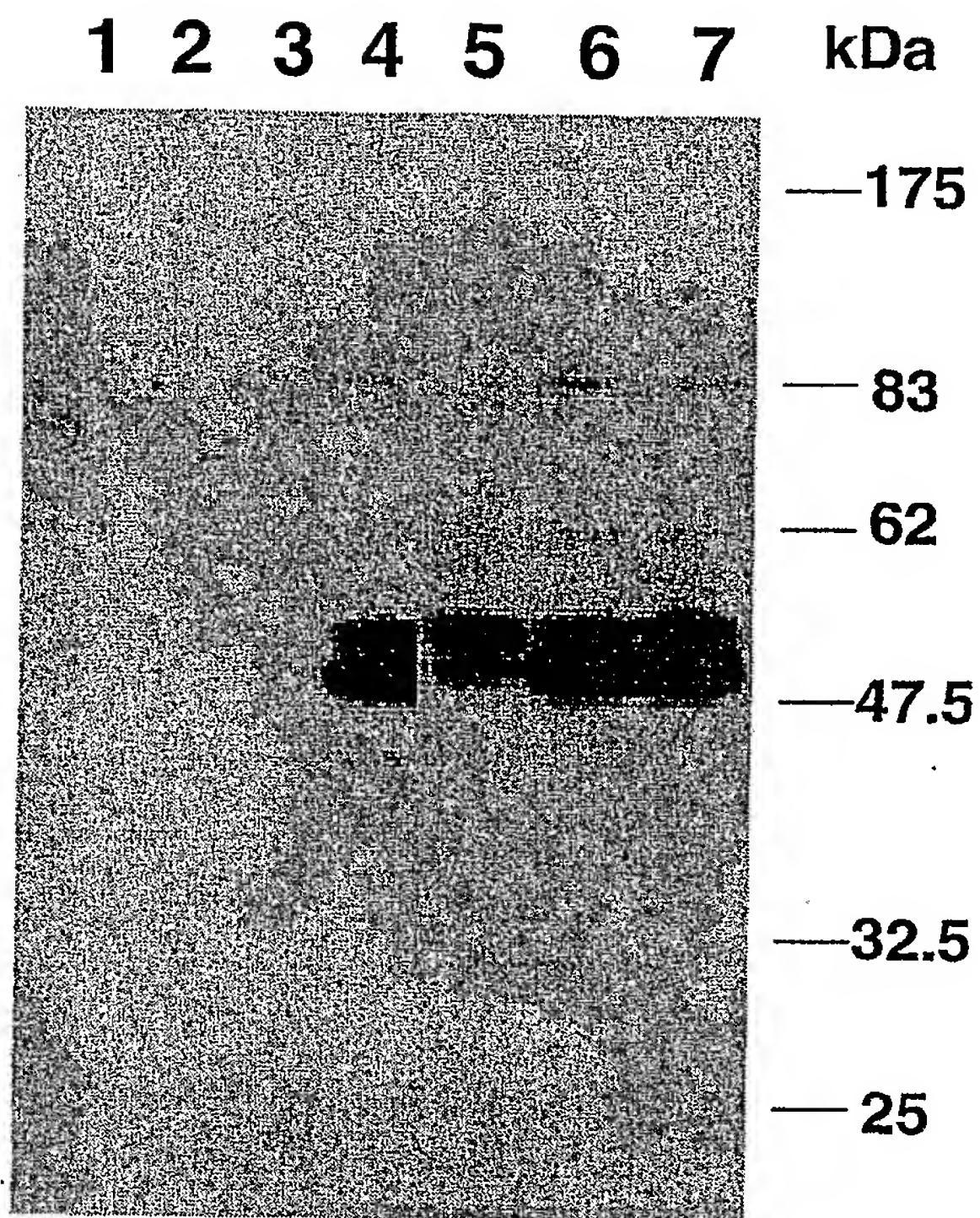
A

心 脳 胎 肺 肝 骨 腎 脾 胸 前 精 卵 小 結 白
臓 盤 臟 格 臟 臍 腺 立 巢 巢 腸 腸 血
筋 腺 球

**B****C**

10/15

図 8



1, 4 : Ovcar-3

1, 2, 3 : 培養上清

2, 5 : Ovcar-5

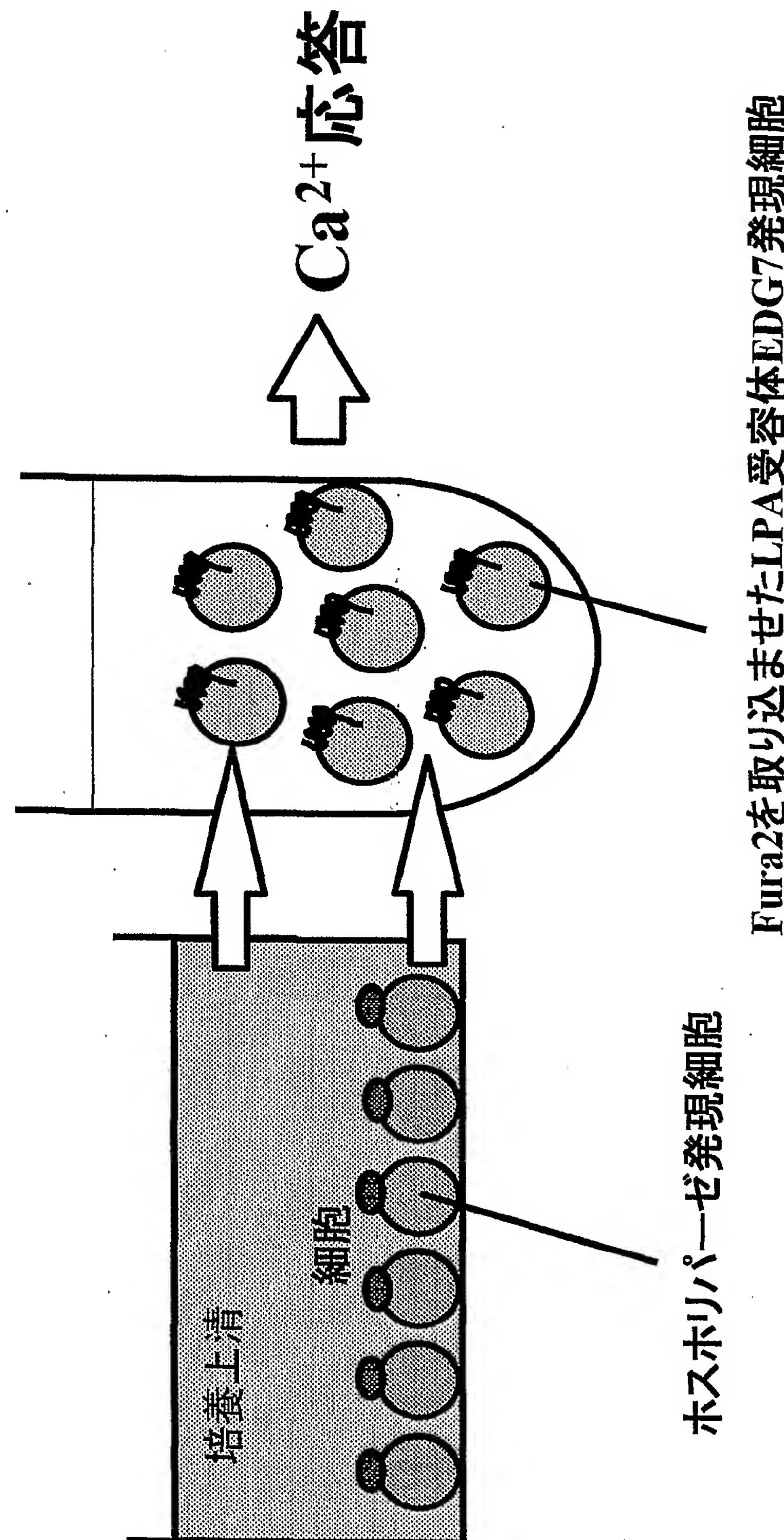
4, 5, 6, 7 : 細胞

3, 6 : Ovcar-8

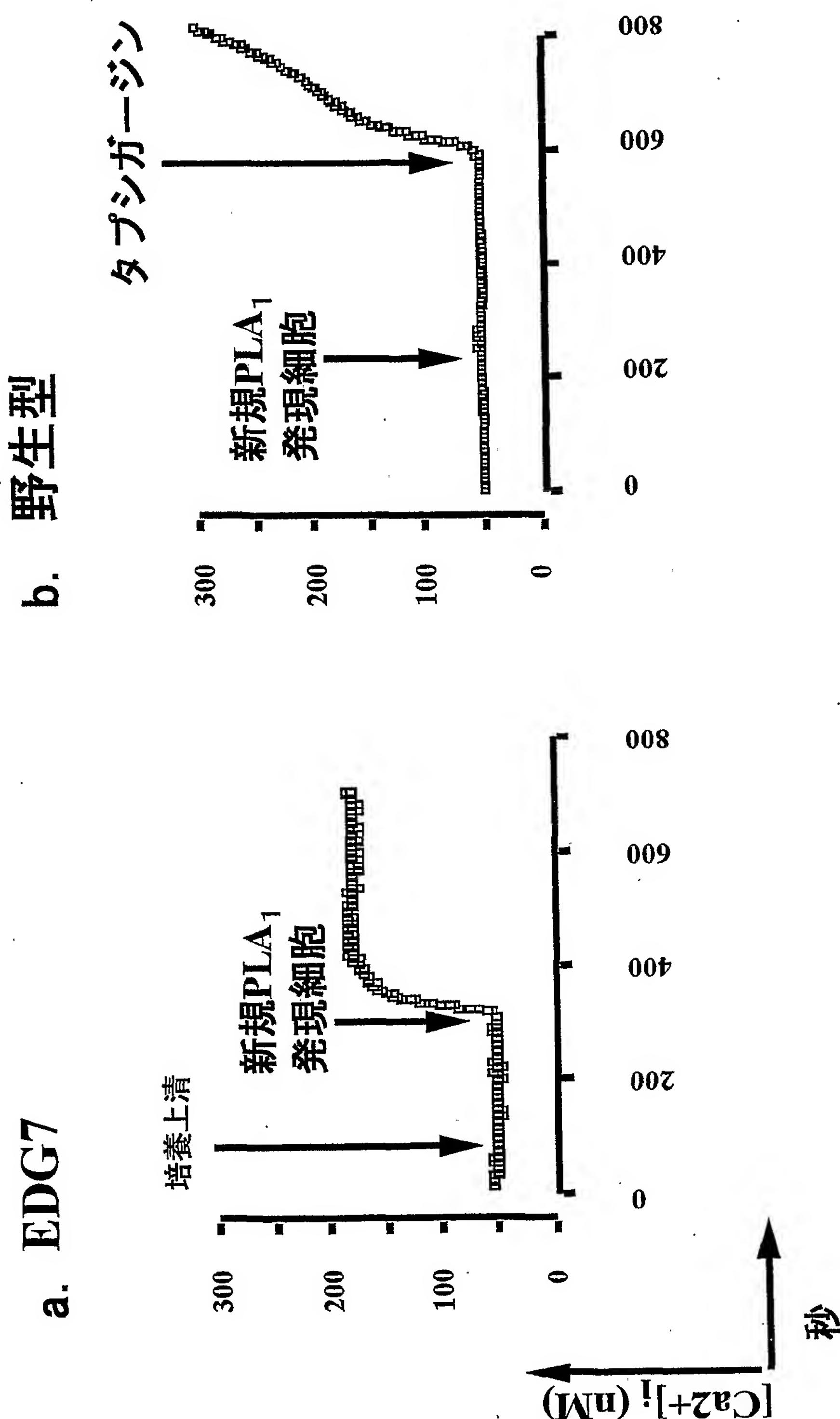
7 : 血小板

11 / 15

図 9



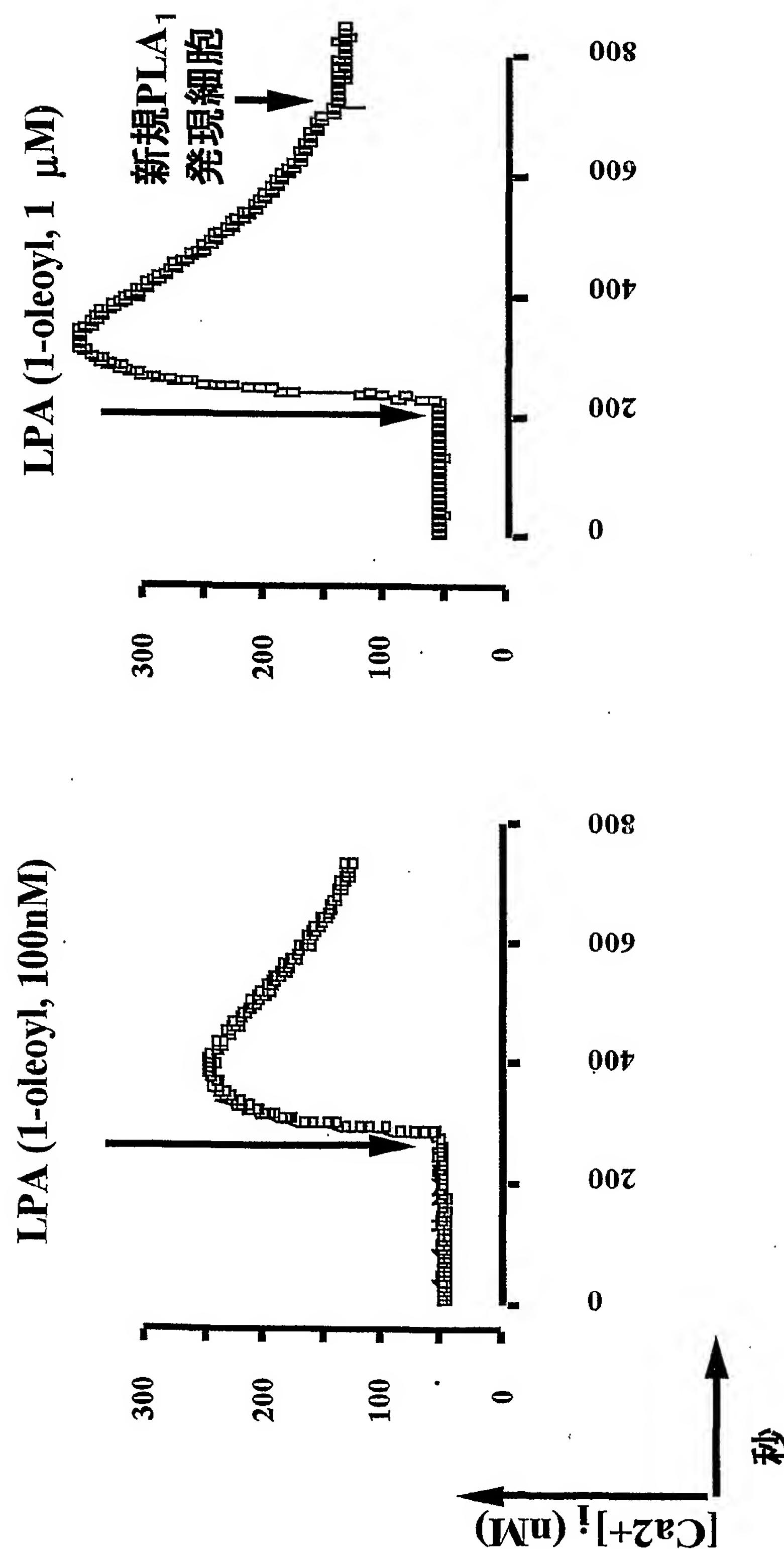
四 1 0



13/15

図 1 0 つづ

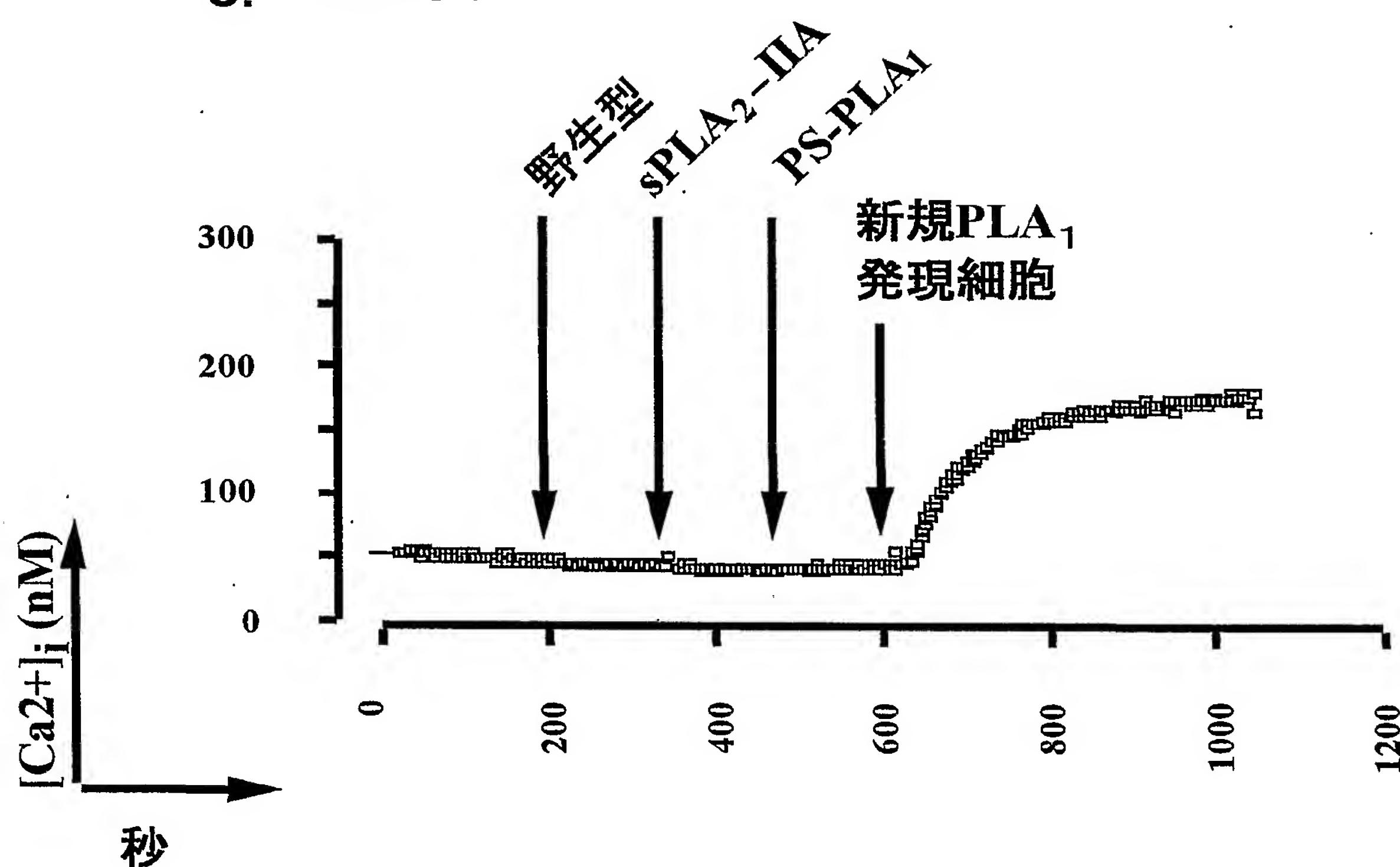
c. EDG7
d. EDG7



14 / 15

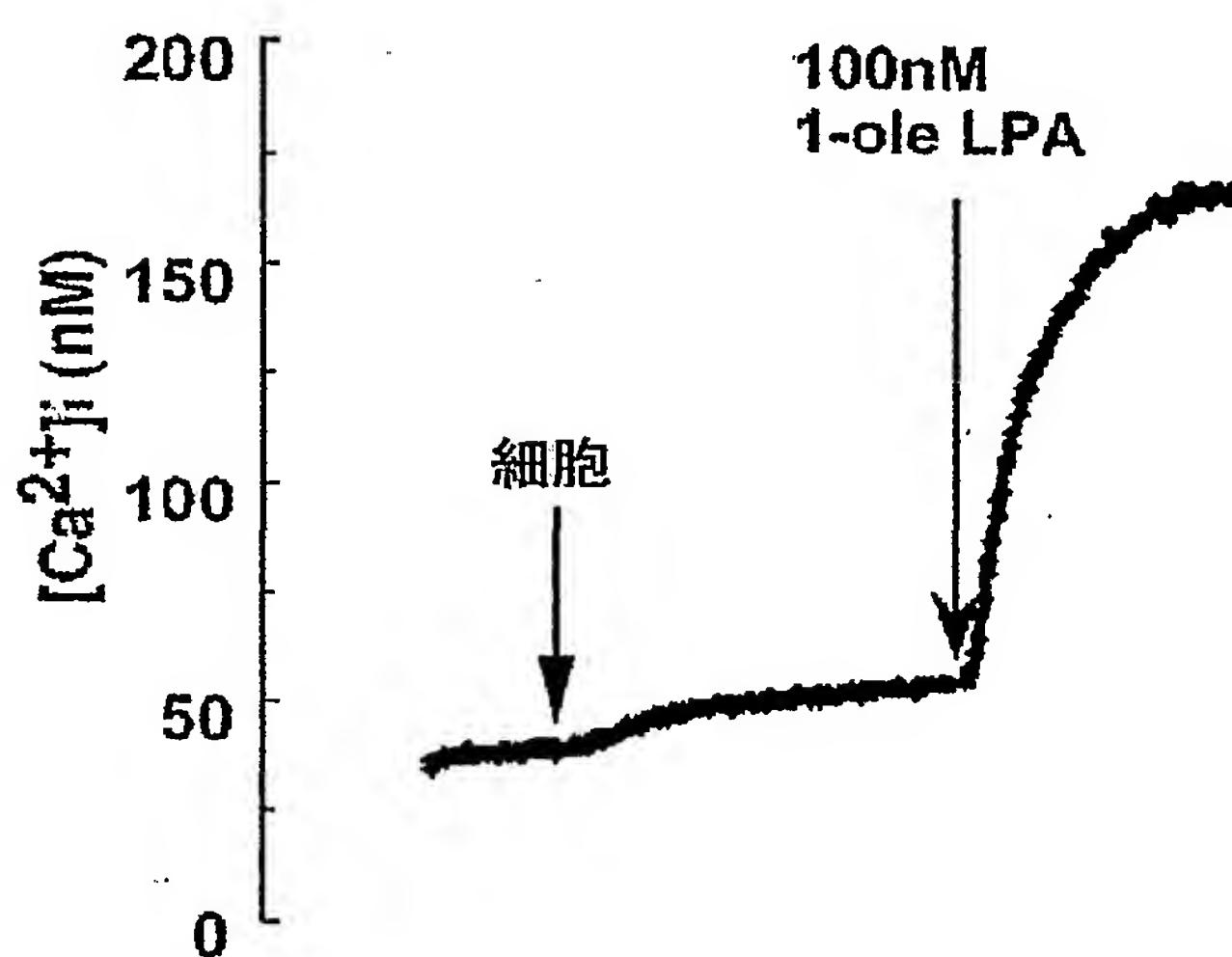
図 1 0 つづき

e. EDG7

f. Ser → Ala 新規 PLA₁

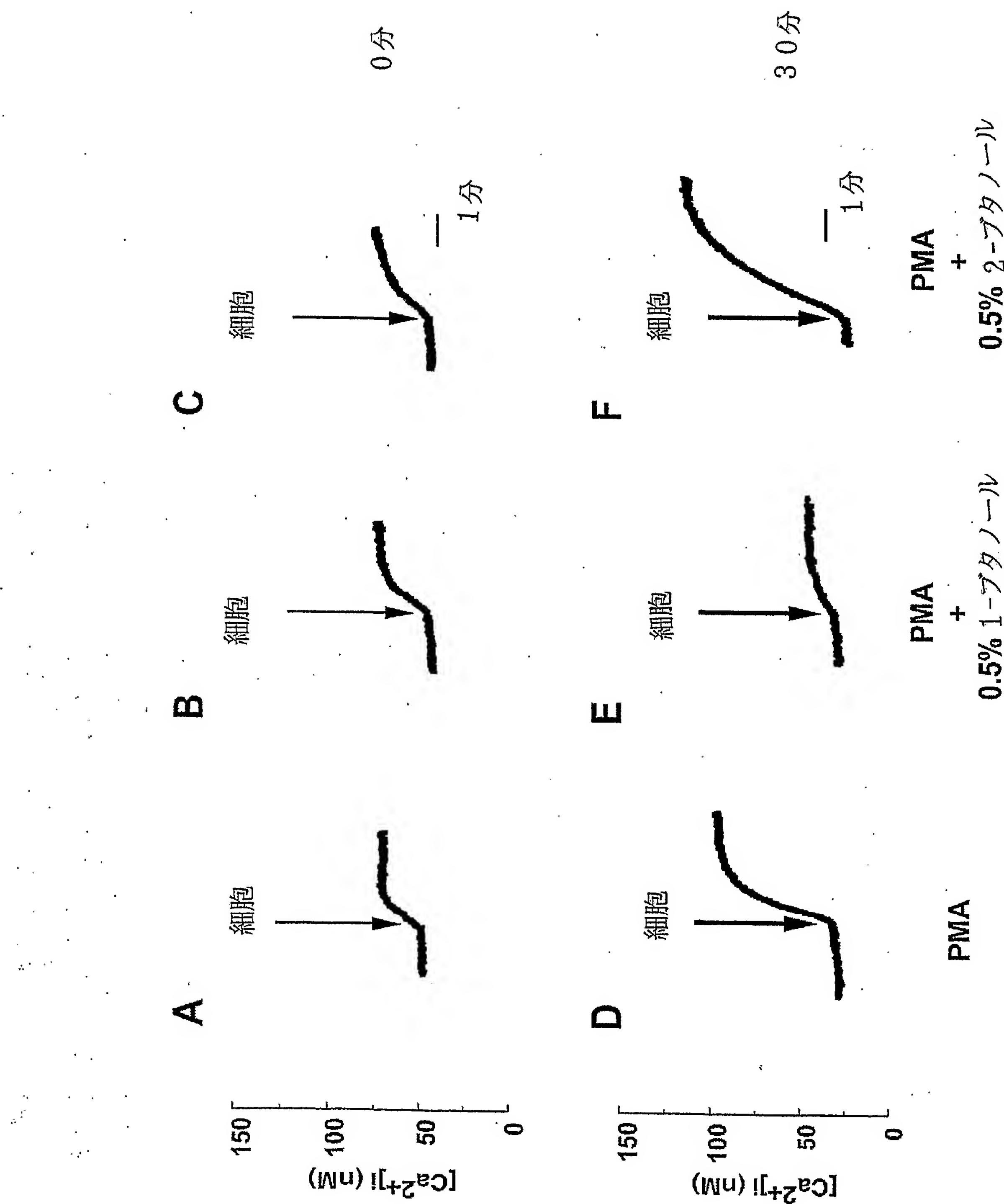
+

EDG7



15/15

図 1 1



SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co., Ltd

5 <120> A novel lipase

<130> GP00-1011

<160> 8

10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 451

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Phe Tyr Leu Phe Ile Ser Leu Leu Cys Leu Ser Arg Ser

20 1 5 10 15

Asp Ala Glu Glu Thr Cys Pro Ser Phe Thr Arg Leu Ser Phe His Ser

20 25 30

25 Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Asn Val Arg Leu Met Leu Tyr Thr Arg

35 40 45

Lys Asn Leu Thr Cys Ala Gln Thr Ile Asn Ser Ser Ala Phe Gly Asn
50 55 60

Leu Asn Val Thr Lys Thr Thr Phe Ile Val His Gly Phe Arg Pro
5 65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Pro Val Trp Met Asp Asp Leu Val Lys Gly Leu Leu
85 90 95

10 Ser Val Glu Asp Met Asn Val Val Val Val Asp Trp Asn Arg Gly Ala
100 105 110

Thr Thr Leu Ile Tyr Thr His Ala Ser Ser Lys Thr Arg Lys Val Ala
115 120 125

15 Met Val Leu Lys Glu Phe Ile Asp Gln Met Leu Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Leu Asp Asp Ile Tyr Met Ile Gly Val Ser Leu Gly Ala His Ile Ser
20 145 150 155 160

Gly Phe Val Gly Glu Met Tyr Asp Gly Trp Leu Gly Arg Ile Thr Gly
165 170 175

25 Leu Asp Pro Ala Gly Pro Leu Phe Asn Gly Lys Pro His Gln Asp Arg
180 185 190

Leu Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe Val Asp Val Ile His Ser Asp Thr

195

200

205

Asp Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Pro Leu Gly Asn Ile Asp Phe Tyr Pro

5 210

215

220

Asn Gly Gly Leu Asp Gln Pro Gly Cys Pro Lys Thr Ile Leu Gly Gly

225

230

235

240

10 Phe Gln Tyr Phe Lys Cys Asp His Gln Arg Ser Val Tyr Leu Tyr Leu

245

250

255

Ser Ser Leu Arg Glu Ser Cys Thr Ile Thr Ala Tyr Pro Cys Asp Ser

260

265

270

15

Tyr Gln Asp Tyr Arg Asn Gly Lys Cys Val Ser Cys Gly Thr Ser Gln

275

280

285

Lys Glu Ser Cys Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Ala Asp Asn Trp Lys Asp

20 290

295

300

His Leu Arg Gly Lys Asp Pro Pro Met Thr Lys Ala Phe Phe Asp Thr

305

310

315

320

25 Ala Glu Glu Ser Pro Phe Cys Met Tyr His Tyr Phe Val Asp Ile Ile

325

330

335

Thr Trp Asn Lys Asn Val Arg Arg Gly Asp Ile Thr Ile Lys Leu Arg

340

345

350

Asp Lys Ala Gly Asn Thr Thr Glu Ser Lys Ile Asn His Glu Pro Thr

5

355

360

365

Thr Phe Gln Lys Tyr His Gln Val Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Gln

370

375

380

10 Asp Leu Asp Lys Val Ala Ala Ile Ser Leu Met Phe Ser Thr Gly Ser

385

390

395

400

Leu Ile Gly Pro Arg Tyr Lys Leu Arg Ile Leu Arg Met Lys Leu Arg

405

410

415

15

Ser Leu Ala His Pro Glu Arg Pro Gln Leu Cys Arg Tyr Asp Leu Val

420

425

430

Leu Met Glu Asn Val Glu Thr Val Phe Gln Pro Ile Leu Cys Pro Glu

20

435

440

445

Leu Gln Leu

450

25

<210> 2

<211> 2445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (89)..(1441)

<400> 2

cacgagaaaa tcccacagtg gaaactctta agcctctgcg aagtaaatca ttcttgtcaa 60

10

tgtgacacac gatctctcca gtttccat atg ttg aga ttc tac tta ttc atc 112

Met Leu Arg Phe Tyr Leu Phe Ile

1 5

15 agt ttg ttg tgc ttg tca aga tca gac gca gaa gaa aca tgt cct tca 160

Ser Leu Leu Cys Leu Ser Arg Ser Asp Ala Glu Glu Thr Cys Pro Ser

10 15 20

ttc acc agg ctg agc ttt cac agt gca gtg gtt ggt acg gga cta aat 208

20 Phe Thr Arg Leu Ser Phe His Ser Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Asn

25 30 35 40

gtg agg ctg atg ctc tac aca agg aaa aac ctg acc tgc gca caa acc 256

Val Arg Leu Met Leu Tyr Thr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Ala Gln Thr

25 45 50 55

atc aac tcc tca gct ttt ggg aac ttg aat gtg acc aag aaa acc acc 304

Ile Asn Ser Ser Ala Phe Gly Asn Leu Asn Val Thr Lys Lys Thr Thr

60

65

70

ttc att gtc cat gga ttc agg cca aca ggc tcc cct cct gtt tgg atg 352

5 Phe Ile Val His Gly Phe Arg Pro Thr Gly Ser Pro Pro Val Trp Met

75

80

85

gat gac tta gta aag ggt ttg ctc tct gtt gaa gac atg aac gta gtt 400

Asp Asp Leu Val Lys Gly Leu Leu Ser Val Glu Asp Met Asn Val Val

10

90

95

100

gtt gtt gat tgg aat cga gga gct aca act tta ata tat acc cat gcc 448

Val Val Asp Trp Asn Arg Gly Ala Thr Thr Leu Ile Tyr Thr His Ala

105

110

115

120

15

tct agt aag acc aga aaa gta gcc atg gtc ttg aag gaa ttt att gac 496

Ser Ser Lys Thr Arg Lys Val Ala Met Val Leu Lys Glu Phe Ile Asp

125

130

135

20

cag atg ttg gca gaa gga gct tct ctt gat gac att tac atg atc gga 544

Gln Met Leu Ala Glu Gly Ala Ser Leu Asp Asp Ile Tyr Met Ile Gly

140

145

150

25

gta agt cta gga gcc cac ata tct ggg ttt gtt gga gag atg tac gat 592

Val Ser Leu Gly Ala His Ile Ser Gly Phe Val Gly Glu Met Tyr Asp

155

160

165

gga tgg ctg ggg aga att aca ggc ctc gac cct gca ggc cct tta ttc 640
Gly Trp Leu Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Leu Phe
170 175 180

5 aac ggg aaa cct cac caa gac aga tta gat ccc agt gat gcg cag ttt 688
Asn Gly Lys Pro His Gln Asp Arg Leu Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe
185 190 195 200

gtt gat gtc atc cat tcc gac act gat gca ctg ggc tac aag gag cca 736
10 Val Asp Val Ile His Ser Asp Thr Asp Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Pro
205 210 215

tta gga aac ata gac ttc tac cca aat gga gga ttg gat caa cct ggc 784
Leu Gly Asn Ile Asp Phe Tyr Pro Asn Gly Gly Leu Asp Gln Pro Gly
15 220 225 230

tgc ccc aaa aca ata ttg gga gga ttt cag tat ttt aaa tgt gac cac 832
Cys Pro Lys Thr Ile Leu Gly Gly Phe Gln Tyr Phe Lys Cys Asp His
235 240 245

20 cag agg tct gta tac ctg tac ctg tct tcc ctg aga gag agc tgc acc 880
Gln Arg Ser Val Tyr Leu Tyr Leu Ser Ser Leu Arg Glu Ser Cys Thr
250 255 260

25 atc act gcg tat ccc tgt gac tcc tac cag gat tat agg aat ggc aag 928
Ile Thr Ala Tyr Pro Gys Asp Ser Tyr Gln Asp Tyr Arg Asn Gly Lys
265 270 275 280

tgt gtc agc tgc ggc acg tca caa aaa gag tcc tgt ccc ctt ctg ggc 976
Cys Val Ser Cys Gly Thr Ser Gln Lys Glu Ser Cys Pro Leu Leu Gly
285 290 295

5

tat tat gct gat aat tgg aaa gac cat cta agg ggg aaa gat cct cca 1024
Tyr Tyr Ala Asp Asn Trp Lys Asp His Leu Arg Gly Lys Asp Pro Pro
300 305 310

10 atg acg aag gca ttc ttt gac aca gct gag gag agc cca ttc tgc atg 1072
Met Thr Lys Ala Phe Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ser Pro Phe Cys Met
315 320 325

15 tat cat tac ttt gtg gat att ata aca tgg aac aag aat gta aga aga 1120
Tyr His Tyr Phe Val Asp Ile Ile Thr Trp Asn Lys Asn Val Arg Arg
330 335 340

20 ggg gac att acc atc aaa ttg aga gac aaa gct gga aac acc aca gaa 1168
Gly Asp Ile Thr Ile Lys Leu Arg Asp Lys Ala Gly Asn Thr Thr Glu
345 350 355 360

tcc aaa atc aat cat gaa ccc acc aca ttt cag aaa tat cac caa gtg 1216
Ser Lys Ile Asn His Glu Pro Thr Thr Phe Gln Lys Tyr His Gln Val
365 370 375

25

agt cta ctt gca aga ttt aat caa gat ctg gat aaa gtg gct gca att 1264
Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Gln Asp Leu Asp Lys Val Ala Ala Ile

	380	385	390	
	tcc ttg atg ttc tct aca gga tct cta ata ggc cca agg tac aag ctc 1312			
	Ser Leu Met Phe Ser Thr Gly Ser Leu Ile Gly Pro Arg Tyr Lys Leu			
5	395	400	405	
	agg att ctc cga atg aag tta agg tcc ctt gcc cat ccg gag agg cct 1360			
	Arg Ile Leu Arg Met Lys Leu Arg Ser Leu Ala His Pro Glu Arg Pro			
	410	415	420	
10				
	cag ctg tgt cgg tat gat ctt gtc ctg atg gaa aac gtt gaa aca gtc 1408			
	Gln Leu Cys Arg Tyr Asp Leu Val Leu Met Glu Asn Val Glu Thr Val			
	425	430	435	440
15	ttc caa cct att ctt tgc cca gag ttg cag ttg taactgttgc caggacacat 1461			
	Phe Gln Pro Ile Leu Cys Pro Glu Leu Gln Leu			
	445	450		
20				
	ggccataaat aatagaaaaga aagctacaac cacaggctgt ttgaaagctt cacctcacct 1521			
	ttctgcaaag cagaaaaagt atgaaaaaac caaggctttt ttcatgtcg tcctatggat 1581			
	gtcacattgt acatcaaaca accttgtat tataaaacga tcctggaaag gagcccctaa 1641			
25	ctagggcaag tcagaaatag ccaggctcgc agcagcgcag cgctgtgtct gctgtgtcct 1701			
	ggggcctccc ttgttccgac ctgtcaattc tgctgcctgt cacgcgggtg gttctgccca 1761			

tcgcggctgc gggtaagca tcttcaaggg aaggacggac tggaggcctc accgtggact 1821

caactctgca ttctccgtgc cacattcctc cagttcccac acgtagaagg gaacgaaact 1881

5

gacgtctacc tcatggggct gctgtgtggg tttgggaggc aaaaatctat gaagggttt 1941

ttgaaatccc ataggtgccatctatgag atgtttgata aatgtgaata tgctttaca 2001

10 tttgggctta tctaatttgc aataagagag cctctctcta tcaacaccag cttctctctc 2061

gggctgtttg ctcagggaaag gcaagaaagc cacgtgctgg ccctctgcct tctctaaagt 2121

gctgttgag catggaggag ctggaggaga tggggatgga ctgacagcta agagggcggc 2181

15

tgctggact agatagtgga tgaagaaaga aggacgagga agccgtgggg cagccttttc 2241

acatggggac aggggatgga gcatgaggca ggggaaggaa aagcagagct tattttcac 2301

20 ctaaggtgga gaaggatcac tttacaggca acgctcattt taagcaaccc ttaagaaatg 2361

tttatgtttc tttattacca atgtaatcta tgattattga agaaatttt gaaaatgcgt 2421

agataaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2445

25

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 3

tgcgaagtaa atcattcttg tgaa

24

<210> 4

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

15 tgtgacatcc ataggacgct actg

24

<210> 5

<211> 33

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cgcggatcca tggtagatt ctacttattc atc

33

25

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 6

ccggaattct tacttgtcat cgtcgtcctt gtagtccaac tgcaactctg ggcaaagaat 60

<210> 7

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

15 ctgcgcacaa accatcaact cctc

24

<210> 8

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aggggacagg actcttttg tgac

24

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-201479 A (Toray Industries, Inc.), 04 August, 1998 (04.08.98) (Family: none)	1-17, 19
A	Henry Higgs et al., "Cloning of a Phosphatidic Acid-preferring Phospholopase A1 from Bovine Testis" J.Biol.Chem., Vol. 273 (1998) pp.5468-5477	1-17, 19

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 26 September, 2000 (26.09.00)	Date of mailing of the international search report 24 October, 2000 (24.10.00)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04441

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 involves methods for treatment of the human body.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/16, C12N15/55, C07K16/40, A61K38/43

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-201479, A (東レ株式会社) 4. 8月. 1998 (04. 08. 98) ファミリーなし	1-17, 19
A	Henry Higgs et al. "Cloning of a Phosphatidic Acid-preferring Phospholopase A1 from Bovine Testis" J. Biol. Chem., 273巻 (1998) p. 5468-5477	1-17, 19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 26.09.00	国際調査報告の発送日 24.10.00		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩	4B	9050
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

・ 請求項18は、ヒトに対する治療方法の発明を含むものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。